UNIVERSITE de PARIS —— FACULTE de PHARMACIE

Année 1963 - 1964 Série E N° 122

THESES

présentées à la
FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE PARIS
pour l'obtention du
GRADE DE DOCTEUR d'ETAT en PHARMACIE

par

JEAN-CLAUDE GOUNELLE
Pharmacien
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris
Chef de Travaux

Première Thèse : 1964

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VITAMINE D ET DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CALCIUM ROLE DES GLANDES SURRENALES

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 1964, devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. G. VALETTE , Président
Y. RAOUL , Professeur
Y. COHEN , Maître de Conférences.

UNIVERSITE de PARIS

FACULTE de PHARMACIE

Année 1963 - 1964

THESES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR d'ETAT en PHARMACIE

par

Jean-Claude GOUNELLE

Pharmacien
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris
Chef de Travaux

Première Thèse : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VITAMINE D ET DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CALCIUM - ROLE DES GLANDES SURRENALES

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

Soutenues le devant la Commission d'Examen.

JURY : MM. G. VALETTE , Président
Y. RAOUL , Professeur
Y. COHEN , Maître de Conférences.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL de la FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE	Doyen
	MM. JANOT	Assesseur
	P. MALANGEAU	Assesseur
	L. RODINEAU	Secrétaire Général
Mme	S. FERRARI	Attachée principale
M.	L. JEANDEL	Attaché
Melle	G. BIDEAU	Secrétaire
Mme	S. CERTAIN	Secrétaire
Mme	M. COUSIN	Secrétaire
M.	A. DROUILLY	Secrétaire
Mme	M.L. ESPINASSE	Secrétaire
Melle	A.M. FAVERJON	Secrétaire
M.	G. FROISSART	Secrétaire

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE	Membre de l'Institut Président de l'Académie de Médecine

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE	Membre de l'Institut
	L. LAUNOY	
	P. FLEURY	
	M. MASCRE	
	M. PICON	
	C. BEDEL	
	R. FABRE	Membre de l'Institut Président de l'Académie de Médecine

PROFESSEURS

MM.	M.M. JANOT	Pharmacie galénique	(T)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie	(T)
	R. PARIS	Histoire Naturelle des médicaments simples d'origine végétale	(T)
	M. GUILLOT	Physique	(T)
	J.A. GAUTIER	Chimie organique	(T)
Melle	S. LAMBIN	Microbiologie	(T)
MM.	Y. RAOUL	Physiologie	(T)
	J. COURTOIS	Chimie biologique	(T)
	L. DOMANGE	Chimie minérale	(T)
	P. CRETE	Botanique	(T)
	R. TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle	(T)
	A. MORETTE	Hydrologie	(T)
	R. CAVIER	Parasitologie	(T)
	A.QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire	(T)
	R. MOREAU	Pharmacie chimique	(T)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques	(T)
	A. GERMAN	Virologie et Sérologie	(T)
	M. PIETTE	Biologie sanguine	(T)
	P. MALANGEAU	Chimie analytique	(T)
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise	(T)
	G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie	(T)
	G. DEYSSON	Cytologie végétale	(T)
	J. FLAHAUT	Minéralogie	(T)
	A. LE HIR	Pharmacie galénique	
	J. RENAULT	Chimie organique	
	C. BOUDENE	Toxicologie et Hygiène industrielle	(T)
	P. LARUELLE	Physique	
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie	
	A. MANGEOT	Pharmacie galénique industrielle	
	P. DELAVEAU	Matière médicale	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0026

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	R. BOURDON	Chimie analytique
	Y. COHEN	Sciences naturelles
	G. LE MOAN	Sciences appliquées
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	C, PAOLETTI	Sciences appliquées
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	J. POISSON	Sciences naturelles
	A. DESVIGNES	Cryptogamie et technique bactériologique
	F. PERCHERON	Sciences appliquées
	J. SAVEL	Biologie animale
	J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET	Parasitologie	
	A. CARLIER	Pharmacie galénique industrielle	(FF)
	A. CAVE	Pharmacotechnie	
	P. CORRIEZ	Physique	
	C. DREUX	Electrochimie appliquée à l'analyse	(FF)
	P. GESTEAU	Physique biologique	
	J.C. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section biologie)	
	H. GUERIN	Micrographie (3ème année) Essais des drogues végétales	
	J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique	
	J. HENRY	Chimie (4ème année)	
Mme	J. HUBERT	Microbiologie	
Melle	Y. JUND	Microbiologie	(FF)
Mme	N. LEGER	Parasitologie	(FF)
MM.	R. LELUC	Microbiologie	
	A. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)	
Melle	M. LOISEAU	Chimie (4ème année)	(FF)
Melle	S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie	
M.	J. MANDEREAU	Pharmacotechnie	(FF)
Melle	H. MORIN	Pharmacodynamie	

M.	NGUYEN PHU LICH	Toxicologie	(FF)
MM.	F. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)	
	R. PERLES	Chimie biologique	
	P. POULLAIN	Hématologie	
Mme	M. ROBERT	Sérologie	
Melle	A. ROLLEN	Biologie végétale	
Mme	N. SALES	Biologie animale	(FF)
Melle	L. SEGUIN	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section physico-chimie)	(FF)
Mme	M. SEILLER	Pharmacie galénique industrielle	(FF)
M.	J. YONGER	Chimie analytique (1ère année)	(FF)

BIBLIOTHEQUE

Melle	Y. RUYSSEN	Conservateur, chargée de la Direction
Melle	S. LAVAUD	Conservateur
Mme	G. KREHMER	Conservateur
Mme	A. DESGRIPPES	Bibliothécaire

*

* *

A Monsieur le Professeur G. VALETTE,

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui nous fait l'honneur de présider le Jury de cette Thèse.
En témoignage de notre très respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Y. RAOUL,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui a été l'instigateur de ce travail et nous a constamment guidé pour le mener à bien.
Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Y. COHEN,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner notre travail.
Nous le prions de trouver ici nos vifs remerciements.

A mes Parents

A mon Frère

A M.A.

En témoignage de profonde affection.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les progrès constatés ces dernières années dans la connaissance du métabolisme calcique ont notamment deux causes principales se rapportant au développement de la radioactivité. L'une, d'ordre général, est l'intérêt porté à un élément voisin du Calcium, le Strontium dont l'isotope ^{90}Sr présente la nocivité des émetteurs de rayonnements β aggravée d'une fixation sur le squelette, l'autre, concernant les techniques est l'utilisation des isotopes radioactifs, calcium 45, calcium 47, vitamine D marquée au carbone 14 ou au tritium. Les méthodes classiques conservent cependant tout leur intérêt face aux nombreux points qui restent à préciser. Actuellement, les questions à résoudre sont encore principalement d'ordre physiologique, puisque, comme nous le préciserons plus loin, le mode d'action des facteurs les plus importants semble être indirect. On trouvera dans les revues ou mises au point récentes de GESCHWIND (39), RAOUL (106), WILLIAMS (148) et de leurs collaborateurs, de nombreuses données sur le métabolisme du calcium. Parmi celles-ci, l'absorption intestinale conditionne toute la suite de ce métabolisme et nous retiendra particulièrement. Sa connaissance reste fragmentaire par suite de l'intervention de facteurs encore mal définis et plus ou moins interdépendants qu'il est commode de classer suivant leur nature exogène ou endogène. Par un rappel des faits connus, nous dégagerons les relations physiologiques les moins bien établies parmi lesquelles nous avons choisi l'objet des recherches exposées ici.

L'apport alimentaire de calcium est évidemment le premier facteur exogène intervenant sur le métabolisme calcique directement et par l'intermédiaire des glandes endocrines régulatrices. Son importance implique dans tout travail concernant ce métabolisme la connaissance précise qualitative et quantitative des régimes de base des animaux.

Parmi les autres facteurs exogènes, la vitamine C interviendrait dans le métabolisme des ostéoblastes (ROCHE, 114) ou au niveau cartilagineux (CHENG et SHANK, 11), éventuellement de façon indirecte par les surrénales sur lesquelles nous nous étendrons plus loin. La vitamine A, qui agit surtout sur les formations épithéliales, est plus ou moins antagoniste de la vitamine D dont elle réduit les effets toxiques à haute dose (CLARK et BASSETT, 13). Cependant, les vitamines A et C ne semblent pas agir sur l'absorption du calcium.

Il n'en est pas de même dans le cas de la vitamine D pour laquelle les faits connus convergent vers une action à tous les niveaux du métabolisme calcique et parfois du métabolisme phosphoré qui est souvent lié. En effet, sur le rein elle simule l'action des parathyroïdes augmentant l'épuration plasmatique du phosphore chez le rat parathyroïdectomisé (CRAWFORD, 21). Sans démontrer son rôle dans la formation même du dépôt minéral, DIKSHIT et coll. (28, 29, 57) ont saisi son intervention dans l'évolution de la matrice de la

région métaphysaire. SOBEL, en 1953 (122), a montré qu'elle pourrait augmenter le produit de solubilité Ca × P du plasma. Mais c'est dès 1909 que SCHABAD (117) a observé l'augmentation de l'absorption intestinale du calcium par l'huile de foie de morue. Cette action est intense puisque 0,025 μg de vitamine D par jour suffisent à guérir le rat rachitique. Cette propriété est la moins discutée de toutes celles attribuées à ce corps. Elle s'accompagne d'un abaissement du pH intestinal, actuellement inexpliqué. Il était naturel d'envisager un mécanisme d'action directe qui aurait ouvert la voie à l'étude biochimique. Mais en 1960, DOWDLE et coll. (30) ont montré l'inefficacité de l'addition de vitamine D dans un sac intestinal in vitro et HARRISSON et HARRISON ont signalé la même année (50) que, administrée per os, mais seulement quatre heures avant l'essai, elle est inefficace. L'absence d'action in vitro, la latence d'action in vivo, confirmées depuis lors, rendent donc peu vraisemblable un rôle direct de ce corps. Ces faits suggèrent, au contraire, soit une transformation préalable en un composé actif, soit la synthèse sous son impulsion et dans un autre tissu d'un composé efficace très différent ou encore son intervention sur le fonctionnement d'un ou plusieurs systèmes enzymatiques. Les renseignements recueillis jusqu'à présent sont très fragmentaires. L'intérêt de recherches portant sur ces points n'est pas seulement théorique car on connait, en pathologie infantile, des rachitismes vitamino-résistants qui pourraient bénéficier d'une meilleure connaissance du métabolisme de la vitamine D.

De tous les facteurs endogènes du métabolisme calcique, la sécrétion des glandes parathyroïdes constitue le plus important. Elle intervient sur tout un ensemble d'échanges minéraux : sur le passage de phosphate entre cellules et liquide extra-cellulaire (voir bibliographie in MUNSON et coll.,87), sur les échanges de calcium au niveau du cristallin (RINALDI, 112), sur les échanges de calcium et de phosphate dans les glandes mammaires (TOVERUD, 135). Mais sa fonction principale est de régler la concentration en ions calcium du plasma sanguin. L'hormone parathyroïdienne a une action directe sur l'os ainsi que l'ont bien montré BARNICOT (3), CHANG (9) et GAILLARD (37). Le fait a été établi in vivo et in vitro par transplantation de tissu parathyroïdien sur un os membraneux et par addition d'hormone purifiée à une culture de tissus. La stimulation des ostéoclastes mobilise le calcium de l'os d'où une tendance à l'hypercalcémie que les parathyroïdes elles-mêmes pourraient corriger par sécrétion d'une deuxième hormone appelée calcitonine par COPP et coll. en 1962 (18) mais dont l'action avait été signalée dès 1957 par MARNAY et PRELOT (81). D'autre part, les glandes parathyroïdes, indépendamment de leur action sur l'excrétion urinaire des phosphates semblent bien favoriser la réabsorption tubulaire du calcium d'après les travaux de TALMAGE et coll. (127,129,130). Cette réabsorption semble être active et distale comme tendent à le prouver les techniques de "diurèse interrompue" et de microponctions utilisées par les groupes de WESSON (146) et de LASSITER (70). Ce n'est qu'en 1958 qu'une action de ces glandes sur l'absorption du calcium fut entrevue par TALMAGE et ELLIOTT (128). Il ne semble pas que celle-ci puisse se manifester par addition d'hormone à l'intérieur d'un sac intestinal isolé (RASMUSSEN, 109). Même in vivo cette action est très controversée puisque WASSERMAN et COMAR en 1961 (142) ne constatent aucune modification du transport calcique après parathyroïdectomie de rats dont les apports en vitamine D sont normaux et que DOWDEL et coll. (30) de même que GRAN (43) font les

mêmes observations sur des rats carencés en vitamine D. Des études récentes de RASMUSSEN (111) avec des radioisotopes du calcium avancent dans cet ordre d'idées que l'hormone réduirait les sécrétions biliaire et intestinale du calcium.

L'existence d'une interaction entre vitamine D et parathyroïdes a été étudiée depuis plusieurs années. Les résultats positifs obtenus par HARRISON et coll. (51) en 1958 en ce qui concerne l'activité de l'hormone administrée ont été confirmés l'année suivante par MARNAY et RAOUL (80, 82), puis infirmés par d'autres auteurs (92, 52, 135). Une telle interaction importante sans doute au niveau de l'os, du rein et de la biosynthèse intraglandulaire (83) serait négligeable au niveau intestinal, l'intervention, même minime, des parathyroïdes étant controversée à ce niveau ainsi que nous l'avons vu précédemment.

Gonades et hormones sexuelles jouent de même un rôle dans le métabolisme calcique. De nombreuses études lui ont été consacrées (BENOIT et coll., 5). Les résultats obtenus sont, en général, moins nets chez les Mammifères que chez les Oiseaux. Cependant l'emploi de calcium 45 conjugué à l'administration d'oestrogènes au rat a permis à MANUNTA et coll. (79) de préciser que l'oestradiol freine dans un premier temps les parathyroïdes entraînant finalement une meilleure fixation osseuse du calcium. Le rôle intermédiaire de l'hypophyse quoique envisagé n'est guère admis actuellement. Quant aux androgènes, ils interviennent sur l'anabolisme protéique donc sur la matrice osseuse. Les actions physiologiques de toutes ces hormones diffèrent beaucoup avec le sexe et ne semblent pas particulièrement se situer au niveau intestinal.

Nous passerons rapidement sur la thyroïde. D'après KRANE et coll. (67), une hypersécrétion de cette glande accroit le pool calcique échangeable et le turn-over osseux sans que l'absorption semble en cause.

Par contre l'antehypophyse retiendra plus longtemps notre attention. Les hormones antehypophysaires procèdent en général par l'intermédiaire de composés synthétisés dans divers organes endocrines et nous venons de voir ce qu'il faut penser de leurs relations avec les ovaires. Par contre, l'hormone somatotrope, outre une action sur la croissance du cartilage, rétablit le mécanisme d'absorption intestinale du calcium chez le rat hypophysectomisé, selon les travaux publiés en 1962 par FINKELSTEIN et SCHACHTER (34). Ces auteurs ouvrent ainsi une voie nouvelle dans les recherches concernant la physiologie du métabolisme du calcium.

Le rôle des capsules surrénales est relativement plus étudié. Si la surrénalectomie conduit à une hypercalcémie pour TAYLOR (131), TIBBETTS (134), LEEMSKA et coll. (72) ou à l'inverse pour CONWAY (17), RAOUL et coll. (105), l'administration de glucocorticoïdes provoque, sans aucun doute, l'amincissement du cartilage épiphysaire et interrompt la croissance. La formation de l'os est bloquée au niveau de la matrice avec raréfaction des ostéoblastes et diminution de la matrice protéique par stimulation de la néoglycogénèse, d'où tendance à l'ostéoporose. La moindre formation d'os nouveau s'accompagne d'une réduction de la quantité de calcium prélevée dans les liquides corporels pour

le dépôt osseux. Il en résulte une tendance à l'élévation du pool calcique extra-osseux compensée en partie par excrétion et en partie par diminution de l'absorption ou augmentation de l'excrétion intestinale. Selon ce raisonnement l'action des capsules surrénales sur l'absorption calcique serait secondaire alors que pour certains auteurs, tels COLLINS (16) le fait primordial est constitué par une diminution de l'absorption sous l'action des glucocorticoïdes, d'où une tendance à l'hypocalcémie entraînant une mobilisation osseuse par stimulation parathyroïdienne. Sans pouvoir préciser si l'action est primaire ou secondaire, tous les auteurs retrouvent cette inhibition de l'absorption à l'exception de SALLIS et HOLDSWORTH qui en 1962 (116) constataient qu'une dose unique de cortisol améliore l'absorption calcique intestinale du poussin rachitique entraînée par la vitamine D.

Cette interaction entre surrénales et vitamine D se manifeste sur la concentration plasmatique en citrates. Celle-ci est accrue par l'hormone parathyroïdienne et la vitamine D ; elle est diminuée par les stéroïdes surrénaliens. En 1957, devant les résultats obtenus par son groupe, DE LUCA (26) avançait que la vitamine D, en inhibant certains enzymes du cycle de KREBS, devait entraîner l'accumulation de citrates complexant le calcium et pouvant intervenir dans le transport de cet ion. Plus tard, il envisageait une réduction de la pénétration mitochondriale des citrates toujours sous l'effet de la vitamine D, alors que HARRISON en 1959 (49) supposait que cette dernière pourrait modifier l'équilibre des citrates entre les compartiments intra et extra-cellulaires en favorisant leur sortie des cellules, le cortisol inhibant cette sortie. Mais ces hypothèses concernant les relations entre vitamine D, cortisol et citrates restaient sans vérification.

Nous venons de voir qu'hormone parathyroïdienne et stéroïdes surrénaliens ont des effets opposés sur la citrémie. D'autres faits montrent leur interaction. Ainsi les glucocorticoïdes tendent à provoquer de l'alcalose qui, associée à la diminution de la citrémie, réduit le taux plasmatique de calcium ionisé ; de même une hypercalcémie peut suivre la surrénalectomie chez des animaux préalablement parathyroïdectomisés si le calcium sérique n'a pas trop diminué (TAYLOR et CAVEN, 131), mais parfois aussi une hypocalcémie (RAOUL et MARNAY, 105).

L'action inverse de la vitamine D et des surrénales sur l'absorption intestinale du calcium est utilisable en thérapeutique et, dès 1955, STAPLETON et EVANS (124) préconisaient la cortisone dans le traitement des hypercalcémies idiopathiques du nourrison. Cependant, rien ne prouve que cortisone et vitamine D agissent de façon opposée sur le même tissu. La cortisone ne provoquerait-elle pas une aplasie surrénalienne par freination hypophysaire lorsqu'on l'administre à forte dose plusieurs jours de suite ? En 1933, COPPENS et METZ (19) signalaient l'importance de la concentration surrénalienne en composés antirachitiques après absorption de vitamine D : 10 heures après administration de 0,1mg / Kg d'ergostérol irradié en solution huileuse à des chiens, le produit doit s'accumuler en proportions élevées dans les surrénales, un extrait de ces glandes guérissant rapidement et totalement des rats rachitiques. Cette constatation semble être tombée dans l'oubli. En tous cas, elle ne se rattache pas aux autres observations plus récentes soulignant peu à peu l'importance des surrénales sur le métabolisme calcique. En 1954, HURIEZ

et TUCHMANN-DUPLESSIS (53) constataient une augmentation de 27 à 127 pour cent du poids des surrénales de rats traités journellement par de la vitamine D. Nous-même, (les résultats statistiquement non significatifs n'ont pas été publiés), observions le même phénomène sur des poussins traités par un autre sécostéroïde antirachitique, la Cétone 250. De son côté HANSSLER montrait en 1956 (47) que la vitamine D, tout en ramenant calcémie et phosphorémie à des valeurs normales, ne prévient pas le rachitisme en l'absence de surrénales chez des rats soumis à un régime rachitigène. Pour cet auteur, la raison pourrait être une synergie et une suppléance entre la vitamine D et la cortisone. Comme on sait, d'autre part, le rôle fondamental joué par le cortex surrénalien dans l'oxydation des cycles C et D des stéroïdes et dans la modification de la chaîne latérale en 17 du cholestérol, on peut formuler l'hypothèse que la vitamine D n'agit pas in vitro sur l'intestin, ni immédiatement après son absorption parce qu'elle serait transformée dans les capsules surrénales.

*
* *

Il resort de l'ensemble de cette étude que la vitamine D reste bien le facteur exogène principal du métabolisme calcique. L'ignorance de l'action directe de ce composé pose le problème préalable de ses relations avec les facteurs endogènes. Parmi ceux-ci les surrénales émergent vis-à-vis de l'absorption intestinale tant au point de vue physiologique qu'au point de vue clinique.

Nous avons donc dans notre travail, cherché à préciser l'action de la vitamine D sur l'absorption intestinale du calcium, notamment dans ses rapports avec le cortex surrénalien. Les résultats de l'étude du métabolisme de la vitamine D à ce niveau, objet de la première partie, nous ont conduit à rechercher la raison physiologique de la localisation surrénalienne préférentielle que nous avons pu mettre en évidence. Aussi la deuxième partie traite-t-elle du problème de l'absorption calcique en présence ou absence de capsules surrénales et de vitamine D. Ce travail réalisé sur des anses intestinales nous a conduit finalement à reprendre le problème de l'acidification dans une étude enzymologique pour rechercher si dans ce cas particulier la vitamine n'aurait pas une action biochimique directe, problème sur lequel bute actuellement son étude.

Avant d'exposer ce travail effectué au Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, qu'il nous soit permis de remercier ici :

Monsieur le Professeur Y.RAOUL qui nous a proposé le sujet de cette thèse et qui a été pour nous un Patron bienveillant dont les encouragements nous ont permis de surmonter de nombreuses difficultés,

Mademoiselle C.MARNAY, Chargée de Recherches au C.N.R.S. pour ses conseils très précieux,

Mademoiselle N. LE BOULCH, Attachée de Recherches au C.N.R.S. qui nous a apporté une aide efficace et dévouée,

Madame A. GUERILLOT-VINET qui a bien voulu prêter son concours pour l'exécution de certains dosages biologiques,

Et tous nos camarades de laboratoire pour leur amicale sympathie.

*
* *

1ère PARTIE

METABOLISME DE LA VITAMINE D ET GLANDES SURRENALES

METABOLISME DE LA VITAMINE D ET GLANDES SURRENALES

POSITION DU PROBLEME - RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

L'absorption intestinale constitue la première phase du métabolisme de la vitamine D lorsqu'elle est administrée per os. L'utilisation de vitamine marquée au carbone 14 par KODICEK (61) jointe à la méthode de chromatographie sur papier (64) ont permis son étude. Cette absorption est importante et l'on retrouve dans les fèces presque exclusivement des métabolites inactifs dont le lieu de formation n'est pas connu (27), Les lipides, comme l'ont montré en premier KNUDSON et FLOODY (60), ainsi que la bile (44) la facilitent.

Passant probablement dans le système lymphatique, on la retrouve dans le sang avec lequel elle gagne les différents tissus et organes. Vingt quatre heures après administration d'un milligramme de vitamine D_2 marquée, en solution huileuse, per os, au rat rachitique, KODICEK (62) retrouve tout le 14_C injecté mais seulement trente pour cent sous forme de vitamine D dont 4/6èmes dans les fèces et 1/6ème dans le foie, les produits de dégradation (70 pour cent) se répartissant principalement entre féces, foie et os. La même année, VAN DEN BOS (137) obtient des résultats semblables avec les vitamines D_2 et D_3 marquées en C_{26} et C_{27} , sa technique ne lui permettant cependant pas de différencier nettement la substance active des produits de dégradation. Chez des rats au sevrage (22) la répartition est semblable pour les deux vitamines per os comme par voie intramusculaire : les analyses portent uniquement sur le foie, le tissu intestinal, les reins et les féces ; la vitamine se retrouve surtout dans le foie, ainsi que dans les féces (après administration per os). L'année suivante, les mêmes auteurs, dans des temps plus courts (compris entre 5 et 24 heures), signalent toujours une accumulation hépatique maximale en 10 heures (per os) ou en 24 heures (voie intramusculaire). C'est au niveau du foie que s'opère, semble-t-il, la destruction de la vitamine D absorbée. Au même moment, alors que nous-même avions entrepris notre travail, ARAKI et ses collaborateurs (1) caractérisent par miscroscopie de fluorescence la vitamine D_2 , administrée per os en solution huileuse et à dose massive, dans la muqueuse intestinale après 2 ou 3 heures, après 4 heures dans le foie ainsi que dans d'autres tissus, reins, poumons, surrénales et tissus adipeux principalement.

C'est l'une des premières fois que les surrénales sont mentionnées parmi les organes renfermant de la vitamine D en quantité non négligeable.

Depuis l'observation de COPPENS et METZ, dans un travail datant de 1954, CRUICKSHANK, KODICEK et ARMITAGE (23) montrent que l'absorption chez le rat per os de 1mg (40.000 UI) aboutit, après 48 heures, à retrouver 0,01 pour cent de la dose injectée dans les surrénales.

Nous reprenons donc ici la question par la recherche d'une localisation tissulaire préférentielle de la vitamine D, d'une part en réduisant au maximum le nombre de variables, d'autre part en utilisant les doses les plus physiologiques possibles : car, tant qu'on administre une forte quantité d'un composé agissant à l'état de traces, on ne peut guère attribuer au tissu qui en recueille une fraction importante qu'un rôle de stockage ou d'élimination, surtout si la concentration n'y est pas particulièrement remarquable. La faiblesse même des doses physiologiques pose un problème : celui du choix des méthodes de dosage.

*

*

TECHNIQUES DE CARACTERISATION ET DE DOSAGE DES VITAMINES D

Il faut se rappeler que ces vitamines sont facilement oxydables. Elles ne sont stables que lorsqu'elles sont conservées à l'obscurité, en tubes scellés, à l'abri de l'oxygène et à température peu élevée, tant sous forme cristalline qu'en solution huileuse ; elles sont détruites par la chaleur et transformées en pyrocalciférol de façon irréversible.

Les méthodes de caractérisation et de dosage employées appartiennent à deux groupes principaux, les méthodes biologiques et les méthodes physico-chimiques.

A / METHODES BIOLOGIQUES

A la base de l'isolement de ces vitamines, elles conservent toute leur importance par suite de leur grande sensibilité : c'est ainsi que la vitamine D_3, étalon mondial d'activité antirachitique titre $4{,}7.10^7$ unités internationales par gramme. Deux espèces animales sont utilisées : le rat qui répond également aux vitamines D_2 et D_3 et le poulet qui réagit plus spécifiquement à cette dernière.

Chez le rat la méthode curative sur l'animal de 21 à 28 jours a la préférence des auteurs. Le rachitisme obtenu avec un régime riche en calcium voit sa guérison appréciée par radiographie simple, "line-test", épreuve au phosphore radioactif, évaluation de la croissance.

Chez le poulet, l'action préventive de la vitamine D_3 est appréciée principalement par radiographie, évaluation de la croissance et de la teneur en cendres des os. C'est la méthode que nous avons retenue pour appuyer les résultats fournis par les techniques physico-chimiques.

B / METHODES PHYSICO-CHIMIQUES

Plus simples et plus rapides, elles reposent sur différents critères.

La présence d'un hydroxyle alcoolique en 3 β et la liposolubilité sont les

propriétés utilisées pour l'isolement des vitamines D par saponification et chromatographie sur colonne et sur papier. Il faut leur ajouter un point de fusion assez faible (87 - 89° C pour la vitamine D_3 et 118 - 119° C (inst.) pour la vitamine D_2) permettant leur distillation sous haut vide.

Leur caractérisation fait appel à d'autres moyens :

- étude du spectre d'absorption : il présente un maximum dans l'ultra-violet à 265 mμ avec un coefficient d'extinction ϵ de $1{,}92.10^4$ pour la vitamine D_3 et de $1{,}82.10^4$ pour la vitamine D_2 : La mesure n'entraînant pas la destruction du produit, ce caractère est très utilisé et nous-même l'avons employé couramment mais son étude nécessite une purification préalable poussée surtout pour une appréciation quantitative.

- les réactions colorées présentent des avantages et des inconvénients inverses des précédents. On peut utiliser : la réaction de LIEBERMANN, la réaction de CARR et PRICE, la réaction de TORTELLI-JAFFE (coloration bleue par addition d'acide acétique et de brome en solution chloroformique à une solution de vitamine également dans le chloroforme alors que l'ergostérol et les autres produits d'irradiation donnent une coloration verte), la réaction de PESEZ (vive coloration rose violet à chaud en présence de furfural et en milieu trichloracétique ne s'observant qu'à partir des triènes conjugués).

La spécificité et la sensibilité de cette dernière réaction, nous l'ont fait choisir préférentiellement, d'une part pour doubler les indications fournies par la spectrographie, d'autre part pour révéler les chromatogrammes sur papier.

ETUDES IN VIVO

I - TECHNIQUE

A/ Choix des animaux

Nous avons choisi le rat albinos mâle (Wistar) pour éviter les influences plus ou moins bien connues de l'oestrus et l'action des oestrogènes.

D'autres avantages s'ajoutaient d'ailleurs aux précédents : injections intraveineuses faciles chez le mâle dans la veine du pénis, accès aisé des surrénales permettant de réduire à quelques minutes le temps séparant la mort de l'animal de l'extraction des stéroïdes.

B/ Voie d'administration

Par voie buccale comme par voie intramusculaire, divers facteurs pouvaient modifier la durée d'absorption ; de plus, la lenteur possible de cette absorption risquait de ne pas nous permettre de déceler une concentration élective dans tel ou tel tissu si celle-ci ne devait être que passagère. L'efficacité thérapeutique de la vitamine D par voie parentérale (40) nous autorisait à utiliser la voie intraveineuse préférentiellement à toute autre, quitte à revenir, ensuite,à l'emploi de la voie orale qui a fait l'objet de quelques expériences.

C/ Vitamine D utilisée

Deux possibilités se présentaient à nous : la vitamine D_2 employée de préférence par le groupe de KODICEK, ou la vitamine D_3 , étalon international de vitamine D adopté par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.)

Nous avons choisi cette dernière pour deux raisons :

- le cholecalciferol est un produit naturel, extrait de l'huile de foie de poisson,

- il devait disparaitre moins rapidement de l'organisme : c'est ainsi que l'hypercalcémie provoquée par l'ergocalciferol est plus rapide, plus marquée et plus transitoire que celle provoquée par le cholecalciferol (78).

En réalité, d'autres possibilités se présentaient qui étaient alors inconnues de nous et dont nous reparlerons ultérieurement.

D/ Dose

Quelle dose devions-nous administrer à nos animaux ? Il fallait choisir entre une dose importante (1 mg par exemple) permettant une recherche relativement aisée mais non physiologique et une quantité modérée présentant des avantages et des inconvénients inverses des précédents : c'est cette dernière solution que nous avons choisie pour les raisons exposées précédemment, fixant la dose moyenne pour un rat à 50 μg, la sensibilité des méthodes de recherche utilisées ne nous permettant guère de déceler moins de 5 μg soit 10 pour cent de la quantité administrée.

E/ Protocole opératoire

Principe

La vitamine en dispersion aqueuse est injectée dans la veine dorsale du pénis d'un rat mâle de 150 à 250 g sous anesthésie à l'éther. Un animal témoin, de même poids, reçoit parallèlement un même volume de solvant.

Après des temps variables, les animaux sont tués. Leurs capsules surrénales prélevées rapidement et pesées, sont, après broyage, traitées par un solvant. Une chromatographie sur alumine permet de déceler éventuellement dans l'effluent, par spectrographie ultra-violette, la vitamine D. On la caractérise alors, soit directement, soit après purification par distillation sous haut vide, par différentes réactions colorées, par chromatographie sur papier, par voie biologique.

Méthode d'administration

Nous avons utilisé des vitamines de différentes provenances :

- Vitamines D_3 synthétiques *

---

* PHILIPPS-ROXANE et MERCK

- Vitamine D_3 d'origine naturelle préparée à partir de l'huile de foie de thon rouge brute de Norvège *.

- Les essais ont été complétés par l'emploi de vitamine D_3 marquée au tritium sur le carbone 7 **.

Devant l'impossibilité d'administrer une solution huileuse par voie intra-veineuse, nous avons choisi de disperser une solution alcoolique concentrée dans du soluté de chlorure de sodium à 9 pour mille. La quantité injectée est fonction du poids de l'animal : 40, 90 et 180 μg pour un rat de 210 g. La concentration finale en éthanol de la dispersion est comprise entre 3 et 6 pour cent, le volume injecté entre 0,25 et 0,35 ml.

Prélèvement

Dès la mort de l'animal (par l'éther éthylique), les glandes surrénales sont prélevées par deux incisions latéro-vertébrales pratiquées sur la bissectrice de l'angle formé par les dernières côtes et la colonne vertébrale. Déposées dans un petit verre de montre, elles sont privées de leur capsule conjonctive et immédiatement pesées sur une balance monoplateau au dixième de milligramme. Sans tarder, on procède à l'extraction des séco-stéroïdes.

Broyage des glandes

On opère dans un petit mortier de porcelaine en présence d'un intermède solide. Le sulfate de sodium sec, utilisé primitivement, donnait toute satisfaction jusqu'au jour où l'on dut changer de lot de fabrication. Les résultats obtenus dès lors ont conduit à effectuer un contrôle poussé :

On ajoute, in vitro, 100 μg de vitamine D_3 en solution éthérée (100 μg/ml) à la quantité de sulfate de sodium (PROLABO pur sec) utilisée pour effectuer le broyage (1,5 à 2 g). Après quelques minutes, on recouvre le sel de 7 à 8 ml d'éther sans peroxydes. Après dix minutes de contact, on sépare la solution éthérée par filtration, l'évapore sous vide. Le résidu, dissous dans l'éther, conserve le spectre ultra-violet de la vitamine de départ.

La même suite d'opérations, réalisée avec 20μg de produit, ne permet pas d'en retrouver la moindre trace : le spectre d'absorption obtenu ne présente aucun maximum entre 240 et 300 mμ. Il en est de même lorsque l'on fait la détermination sur la solution éthérée filtrée mais non évaporée.

---

* Nous remercions les Etablissements PROCHIMEX (Marseille) qui ont préparé cet échantillon d'huile

** PHILIPS-DUPHAR - Solution à 1mg/ml dans l'éther de pétrole
Activité théorique = 7 μC/mg.

Avec un sulfate de sodium d'origine différente (MERCK pur anhydre), la vitamine D 3 (20 et 100 μg) ne peut être caractérisée : déplacement du maximum d'absorption à 290 mμ ou spectre "descendant" de 240 à 300 mμ avec épaulement à 270 mμ.

Avec de la poudre de verre, par contre, le spectre de 30 μg de vitamine D 3 n'est pas sensiblement modifié. Tout au plus note-t-on un déplacement du spectre de 3 mμ vers les courtes longueurs d'onde. La faible masse tissulaire soumise à l'extraction l'autorisant (teneur en eau minime), c'est donc la poudre de verre qui sera utilisée en remplacement du sulfate de sodium des premiers essais.

Extraction

La vitamine D est très soluble dans l'éther éthylique. On prive ce solvant de peroxydes par contact avec du chlorure stanneux, puis distille en rejetant les fractions de queue. Le solvant est séché sur chlorure de calcium.

Le broyat de surrénales est extrait à trois reprises par 5 ml d'éther : contact de 10 minutes, séparation du solvant par décantation et filtration sur filtre sans cendres et sans graisses. Les solutions éthérées sont concentrées au fur et à mesure par évaporation sous vide, à température inférieure à 60° C dans un petit ballon à col rodé. Elles doivent être traitées sans délai. Avec le résidu d'évaporation, on réalise un chromatogramme liquide.

Isolement

1) Les solvants

Dès qu'on envisage cet isolement, d'autres problèmes surgissent dont celui des solvants. La chromatographie sur colonne d'alumine permet un isolement convenable de la vitamine D. L'élution est obtenue par passages successifs de solvants purs ou mélangés : éther de pétrole et éther éthylique. Craignant d'être interrompus dans les expériences par cessation de fabrication de l'éther de pétrole, type "Chemin de Fer", nous avons été conduits à lui trouver un remplaçant éventuel. Sept solvants furent étudiés :

- éther de pétrole (type "Chemin de Fer", rectifié, E 40-60° C)

Chromatographiée sur alumine, la vitamine D 3 passe dans une seule fraction, éther de pétrole-éther éthylique (9 p. - 1 p.) sans modification de son spectre ultraviolet. Ce solvant est, de même, utilisable pour éluer la vitamine D 2 .

- éther de pétrole (rectifié, E 40-60° C)

Dans les mêmes conditions, on ne retrouve qu'une partie du produit de départ sous sa forme initiale.

- éther de pétrole (lavé et rectifié, E 40-60° C)

Le solvant est lavé par agitation avec de l'acide sulfurique jusqu'à ce que l'acide reste incolore. On neutralise ensuite par de la lessive de soude, lave à l'eau distillée jusqu'à neutralité des eaux de lavage, sèche sur sulfate de sodium anhydre (5 heures de contact), distille. Par chromatographie de 100 μg de vitamine D_3, on ne retrouve que 85 pour cent du produit de départ, accompagné de produits de transformation (aucun maximum d'absorption entre 240 et 300 mμ).

- éther de pétrole (rectifié, E 30-50° C)

Toute la vitamine D_3 de départ est éluée par le mélange de solvants éther de pétrole-éther éthylique (9 p. - 1 p.) même si l'on ne part que de 20 μg de produit (et de 0,50 g d'alumine).

- pentane pur et pentane redistillé (E 36° C)

Le pic d'élution n'est pas assez aigu et l'existence d'une absorption de base importante en lumière ultraviolette dans les fractions 9-1 et 5-5 ne permet pas une détermination précise du stérol.

- hexane

98 des 100 μg chromatographiés sont élués par le mélange hexane-éther éthylique (9 p. - 1 p.)

- heptane

L'élution de la vitamine D_3 par l'heptane ne se fait pas sans altération de son spectre ultraviolet.

Ainsi, de tous ces solvants, seuls l'éther de pétrole (E 30-50° C) et l'hexane sont susceptibles de remplacer l'éther de pétrole type "Chemin de Fer"

La technique d'isolement employée est la suivante :

2) Matériel - Réactifs

- Microtubes de verre Pyrex (diamètre intérieur = 8 mm, hauteur = 200 mm) munis d'un étranglement et d'un robinet (voie = 2 mm) à quelque distance de la base.
- Flacons de verre de 15 ml pour recueillir les fractions de chromatographie.
- Ballons de verre Pyrex, à col rodé de 20 ml de capacité.
- Alumine Merck préparée selon BROCKMANN ($AL_2 0_3$ standardisiert, P.M. = 101,94)
- Ether de pétrole (type "Chemin de Fer" rectifié, E 40-60° C)
- Ether éthylique privé de peroxydes et séché sur chlorure de calcium.

3) Mode opératoire

Le tube est rempli selon le mode humide : on y introduit successivement le solvant (éther de pétrole), une petite bourre de coton, un disque de papier filtre (sans cendres et sans graisses), puis, lentement, 1 g d'absorbant sec et finalement un second disque de papier protégeant la face supérieure de l'alumine. L'excès de solvant, au-dessus du sommet de la colonne, est éliminé.

Le résidu d'évaporation de l'extractum éthéré est repris par 1 à 2 ml d'éther de pétrole en plusieurs fois (en tiédissant le ballon, la première fois, au bain-marie). Cette solution est introduite au sommet de la colonne, puis éluée par passages successifs d'éther de pétrole, de mélange éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.) et (5 p. - 5 p.) et finalement d'éther. L'effluent correspondant à chaque solvant éluant est séparé en trois fractions (15, 15 et 10 ml).

Cette méthode permet l'isolement de la vitamine D et de ses esters ainsi que celui d'un autre composé antirachitique, la Cétone 250 (103) : les esters de la vitamine D_3 sont élués par l'éther de pétrole. On les isole par une seconde chromatographie sur alumine après saponification par la potasse méthanolique à 5 pour cent et extraction éthérée. Vitamine D et Cétone 250 sont éluées soit par l'éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.), soit par le mélange des deux solvants à parties égales.

Pour le tissu hépatique, la technique est analogue ; la vitamine A est éliminée par passage sur "floridine" * des différentes fractions de chromatographie.

Caractérisation physico-chimique

— La vitamine D ayant dans l'ultraviolet un spectre d'absorption simple et un maximum à 265 mμ de forte densité ($E^{1\%}_{1cm}$ # 500 (éther)), on peut utiliser cette caractéristique. Cette région du spectre est passablement encombrée parce que lointaine. Aussi ce critère n'a-t-il qu'une valeur quantitative approximative lorsqu'on l'applique directement à une fraction de chromatographie. Il ne peut, à plus forte raison, permettre de caractériser la vitamine D dans un extrait éthéré brut ni même dans l'insaponifiable d'un tel extrait ou d'un tissu. Il présente cependant deux avantages importants : ce sont la non-altération du produit examiné d'une part, et, d'autre part, la rapidité d'exécution encore que la mise en oeuvre de la méthode implique l'emploi d'un solvant transparent aux rayonnements ultraviolets, d'où la nécessité d'évaporer à sec les différentes fractions et de les reprendre par un solvant convenable.

— On pourra éventuellement effectuer le contrôle précédent après distillation sous haut vide à température inférieure à 100° C :

La fraction de chromatographie est concentrée sous vide à 0,5 à 1 ml, transvasée quantitativement dans un tube de verre fermé à une extrémité (longueur = 20 mm, diamètre intérieur = 4 mm) dans lequel on l'évapore grâce à un courant d'Azote. Le tube est alors lui-même introduit dans un tube de verre assez long A, (fig 1), glissé dans un tube de pyrex B à extrémité rodée le reliant à la partie C de l'appareil, en communication avec le vide grâce au robinet de verre D à double voie permettant une rentrée d'air en fin d'opération. Le vide est obtenu :

— pour le vide primaire, par une pompe à palettes dans l'huile

— pour le vide secondaire, par une pompe à vapeur de mercure.

Lorsque la pression atteint 1/100ème de millimètre de mercure, on commence le chauffage à l'aide d'un four électrique transparent à rhéostat qui entoure l'ensemble A,B,C, jusqu'à l'ouverture du tube intérieur. Les températures sont lues sur un thermomètre à mercure T situé entre les tubes A et B. La pression est maintenue constante ($7{,}6.\ 10^{-3}$ mm de Hg). Les substances distillées se déposent en un mince film le long des parois du tube de verre A, situées à l'extérieur du four.

---

* type XXS de la Floridine Adsorbents Company, Warren (Pennsylvanie) U.S.A.

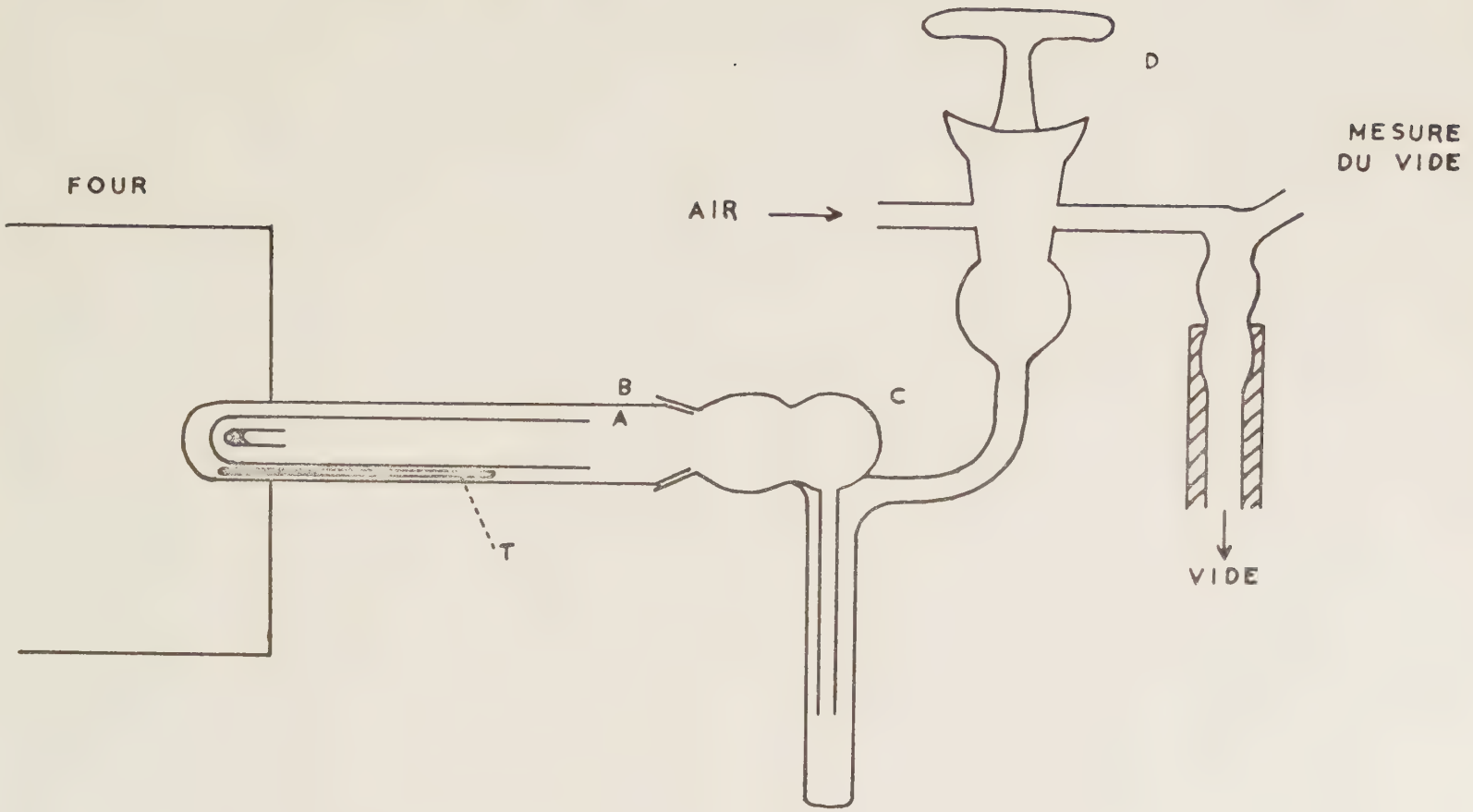


Figure 1 - Appareil à distillation sous vide

Une tentative de distillation de l'extrait éthéré brut de surrénales n'a pas permis de caractériser la vitamine D aussi n'opère-t-on qu'après chromatographie. Après addition, in vitro, de 25 μg de vitamine D_3 à des fractions de chromatographie de surrénales d'animaux témoins, on retrouve par distillation 22 μg du produit : on a donc une certaine perte qui semble difficilement évitable par suite du peu de substance dont on est parti.

- La spectrographie infrarouge permet éventuellement de caractériser un produit pur. Elle n'a pas été employée couramment, la substance n'étant pas récupérable après la mesure.

- Diverses réactions colorées sont utilisables : réaction de CARR et PRICE, modifiée par RAOUL et MEUNIER (108), réaction au furfural de PESEZ (96).

- Chromatographie de partage inversé sur papier : les différentes techniques de chromatographie sur papier de la vitamine D ont été passées en revue par LEDERER (71). De nouvelles méthodes ont été signalées plus récemment par SORRELS et REISE (123) d'une part, par SUZUKI et SAHASHI de l'autre (126).

Nous employons celle de KODICEK et ASHBY (64). Des trois systèmes de solvants proposés par ces auteurs, nous avons retenu le méthanol mais en abaissant sa teneur en eau de 5 à 1 pour cent, c'est-à-dire en diminuant le pouvoir éluant du solvant. Cette modification nous permet éventuellement de caractériser avec plus de facilité des stérols de Rf supérieurs à celui de la vitamine D et qui, avec le méthanol à 95 pour cent, seraient égaux à l'unité ; c'est le cas de la Cétone 250 qui pourrait être l'un des métabolites de la vitamine D.

Technique

- Le papier (Whatman n° 2) est imprégné d'huile de paraffine par immersion dans une solution à 5 pour cent dans l'éther de pétrole (E 40-60° C) suivie d'un séchage à l'air. La phase fixe est ainsi très lipophile.

- Les cuves utilisées sont des bocaux de verre cylindriques hauts de 40 cm (diamètre intérieur = 85 mm) fermés par des bouchons de liège traversés par un crochet de verre permettant la fixation du chromatogramme (GORDON et HEWEL, 41). En chromatographie descendante, nous employons un auget de forme particulière adaptée aux formes et dimensions des cuves, suspendu au bouchon par une tige de verre soudée.

- Les solvants - Le méthanol (saturé d'huile de paraffine) permet d'opérer aussi bien en chromatographie ascendante qu'en chromatographie descendante (MAYER, PICARD, WOKES, 84).

La Cétone 250 peut aussi être chromatographiée à l'aide d'un autre système de

solvants : n butanol, huile de paraffine (100 p. - 10 p.)

– Les solutions - La substance à chromatographier est dissoute dans l'éther sans peroxydes. Nous utilisons habituellement des taches comportant une dizaine de microgrammes du stérol. Lorsqu'il n'est pas possible d'obtenir une solution de concentration suffisante, nous déposons successivement jusqu'à 10 à 15 gouttelettes au même point, activant l'évaporation grâce à un courant d'Azote arrivant sous le papier par un tube de verre fixé au bord de la paillasse.

– Révélation des chromatogrammes - Une fois le développement terminé (4 à 5 heures dans le cas du méthanol, ce qui correspond à un parcours voisin de 22 cm pour le solvant, et non 16 ou 17 heures comme le signalent KODICEK et ASHBY, 64), le papier sur lequel on a marqué la limite atteinte par le front du solvant est séché devant la porte ouverte d'une étuve à 100° C.

On se sert habituellement, pour révéler les séco-stéroïdes, de la réaction au furfural obtenue par action de solutions benzéniques d'acide trichloracétique et de furfural sur une solution benzénique du séco-stéroïde à chaud. Alors qu'en solution, dans les conditions indiquées par l'auteur, nous trouvons pour la vitamine D 3 une limite de sensibilité comprise entre 5 et 10 μg, limite que l'on peut diminuer environ de moitié en opérant avec des quantités inférieures de réactif, sur papier nous pouvons déceler une tache comportant moins de 1 μg de vitamine D 3 .

Les feuilles de 35 × 7 cm permettent de révéler les chromatogrammes par immersion (rapide pour éviter toute dissolution) dans le réactif (solution benzénique de furfural à 2 pour cent : 2 ml, solution benzénique d'acide trichloracétique à 85 pour cent : 10 ml) déposé dans un couvercle de boîte de Pétri, suivie d'un chauffage de la feuille à l'aide d'un radiateur infra-rouge. On évite ainsi la projection dans l'atmosphère, par pulvérisation, de substances caustiques. Les colorations obtenues sont stables plusieurs jours ; les papiers peuvent être conservés moyennant quelques précautions. Dans ces conditions, la D.O.C.A. et la cortisone ne donnent aucune coloration, un extrait cortico-surrénalien total *, une tache brunâtre et non violette.

Le réactif au trichlorure d'antimoine (RAOUL et MEUNIER, 108) moins spécifique, peut, de même, être employé par immersion du chromatogramme chauffé au préalable à 50-70° C.

On peut appliquer, pour caractériser les séco-stéroïdes cétoniques, la technique signalée par RAHANDRAHA et RATSIMAMANGA (101). Le chromatogramme est imbibé d'une solution acétique à 10 pour cent de réactif T de GIRARD.

---

* Cortine naturelle, LAROCHE NAVARRON

Dans le cas de la Cétone 250, il faut alors chauffer (15 minutes à 100° C) pour obtenir l'hydrazone. On trempe ensuite le papier dans du réactif de DRAGGENDORF modifié par R.MUNIER et M. MACHEBOEUF (86), dilué 3 fois. Il se forme un ammonium quaternaire coloré en jaune orangé. On peut ainsi mettre en évidence au moins un carbonyle actif avec 10 μg de substance. D'autre part, il est possible sur la même tache, après séchage, de faire la réaction au furfural : la coloration passe alors au violet.

Résultats

Vitamine D 3 : Utilisant du méthanol à 99 pour cent et non à 95 pour cent, comme KODICEK et ASHBY, nous obtenons des Rf inférieurs à ceux signalés par ces auteurs, soit 0,65 ($\pm$ 0,05).

Cétone 250 : Elle présente pour le méthanol à 95 pour cent un Rf de 1 et pour le méthanol à 99 pour cent un Rf moyen de 0,85 ($\pm$ 0,10). Ce dernier solvant permet donc de meilleures séparations et caractérisations. La dispersion des résultats constatée ici peut être due à de légères différences de structure suivant l'origine, déjà signalées (104).

Les valeurs obtenues par KODICEK pour la vitamine D 3 ont été critiquées par MAYER, PICARD et WOKES (84). Nous avons aussi noté parfois de grandes variations entre des expériences séparées mais paraissant réalisées dans des conditions semblables : le Rf de la vitamine D 3 a atteint, une fois, la valeur de 0,92. Cependant, contrairement à MAYER, pour des quantités de produit dans un rapport de 1 à 4, développés sur une même feuille, nous trouvons des Rf identiques. La température de la pièce joue, bien entendu, un rôle (Rf inférieur à basse température) mais d'autres facteurs interviennent certainement : il est préférable de laisser tremper le papier un temps constant (15 minutes) dans la solution d'huile de paraffine.

Cet ensemble de données confirme le fait que la mesure du déplacement de la substance étudiée par rapport au déplacement d'un témoin constitue une appréciation plus sûre que la mesure du Rf.

- Mesure de la radioactivité d'extraits tissulaires

Les rayons β de faible énergie émis par le tritium sont comptés par scintillation en milieu liquide * à partir des extraits évaporés sous vide et repris par 20 ml du mélange scintillant suivant :

* Liquid scintillation counting system LSC - 10 B, TRACERLAB, U.S.A.

P P O (2,5 diphényloxazol)	4,0 g
P O P O P (1,4 di (2,5 phényloxazolyl) benzène . . .	0,010 g
Toluène	100 ml

Caractérisation biologique (100)

Le poulet réagissant plus spécifiquement la vitamine D 3 ; c'est cet animal qui sert ici aux contrôles biologiques quantitatifs.

Le test préventif est appliqué à des poussins LEGHORN mâles *, âgés de 3 jours, recevant un régime totalement dépourvu de vitamine D, équilibré, mais pauvre en Calcium et Phosphore (0,60 pour cent de Ca, 0,68 pour cent de P) ; les substances à étudier sont administrées chaque jour per os en solution dans 0,10 ml d'huile d'arachide, les témoins recevant le même volume d'huile. Le 21 ème jour, après pesée et radiographie antéropostérieure de l'articulation tarso-métatarsienne, les animaux sont sacrifiés par section de la carotide. Le sang de chaque animal est recueilli. Après dissection minutieuse, les fémurs sont dégraissés à l'éther, séchés, pesés et calcinés jusqu'à cendres blanches. La teneur en calcium du sérum est déterminée après calcination de l'échantillon par la méthode au complexon de GAUTIER et PIGNARD modifiée (99). L'intensité du rachitisme est chiffrée classiquement par le pourcentage de cendres des fémurs ainsi que par l'indice de GUERILLOT-VINET : celui-ci est le rapport des distances tarso-métatarsiennes et tibio-métatarsiennes mesurées sur les radiographies. Chez les animaux normaux, cet indice est inférieur ou égal à 0,20 ; il atteint ou dépasse 0,30 chez les poulets rachitiques.

* Elevage du BOUT-LAMBERT - Goupillières (Seine et Oise)

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A/ Animaux témoins

La vitamine D ou ses métabolites sont recherchés dans les capsules surrénales prélevées sous anesthésie à l'éther sur des animaux n'ayant subi aucun traitement (1er lot), dans les surrénales de rats ayant reçu 30,60 ou 120 minutes au préalable une injection intraveineuse de solvant (2ème, 3ème, et 4ème lot).

A une exception près *, les densités optiques lues à 250 comme à 265 mμ ne dépassent jamais 0,150 pour une fraction de chromatographie obtenue à partir de 50 mg de surrénales, évaporée à sec et reprise par 3 ml d'éther éthylique **.

Dans les surrénales des 3 animaux du premier lot, traitées simultanément, on ne décèle ni vitamine D , ni métabolite (par spectrographie ultraviolette).

Dans les surrénales des 13 animaux du second lot, réparties en 6 groupes, il en est de même. Les densités optiques des fractions éther de pétrole et éther de pétrole-éther (5 p. - 5 p.) décroissent régulièrement de 240 à 300 mμ. Leur intensité dans la fraction éther de pétrole varie en fonction du poids de glande traité. Pour les fractions éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.), le spectre ultraviolet offre un plateau horizontal de 255 à 270 mμ.

Les extraits en provenance des surrénales des 2 rats du troisième lot présentent des spectres identiques aux précédents.

Les extraits en provenance des surrénales des 2 rats du dernier lot ne présentent pas de caractéristiques particulières.

---

* Sans raison apparente les extraits de surrénales de deux rats traités le même jour ont fourni des fractions de chromatographie de forte densité optique et présentant pour l'un des deux animaux des maxima d'absorption à 250 mμ dans les fractions éther de pétrole.

** Un spectre ultra-violet caractéristique de la vitamine D_3 , présentant au maximum d'absorption une densité optique de cette intensité (cuve de 10 mm de traversée), correspondrait à 9 μg de produit.

B/ Animaux traités par de la vitamine D

1) Administration per os

Ces quelques essais ont un but uniquement comparatif ; ils n'ont pas été poursuivis pour les raisons exposées précédemment.

Deux heures après son absorption en solution huileuse par deux rats (30 μg par animal), on retrouve après distillation sous haut vide, 52 μg soit 85 pour cent dans le contenu intestinal, 9 μg soit 15 pour cent dans la muqueuse de l'intestin grêle (ou adsorbés à sa surface), le tout sous forme d'esters, rien dans les glandes surrénales (Tableau I).

Une heure après administration à deux rats, en dispersion hydro-alcoolique, à la même dose, on retrouve, après distillation, 50 pour cent sous forme alcool dans le contenu intestinal, 25 pour cent estérifiés dans la muqueuse, des traces dans le foie (Tableau I).

TABLEAU I

Localisation de la vitamine D_3 administrée per os (30 μg)

Pourcentages de la quantité initiale
retrouvés dans différents tissus après 1 ou 2 heures

	Solution huileuse 2 h	Dispersion aqueuse 1 h
Contenu intestinal	85	50
Muqueuse intestinale	15	25
Foie	-	traces
Surrénales	0	-
Total retrouvé	100	75

2) Administration par voie intraveineuse

a) Vitamine D_3 de synthèse : Les rats sont tués 30 minutes, 1, 2, 4 ou 8 heures après avoir reçu la vitamine D. Pour la caractérisation spectrographique on prend comme solvant de contrepartie soit de l'éther éthylique, soit la fraction de chromatographie correspondante obtenue à partir d'un animal témoin traité parallèlement.

On constate l'absence constante d'esters de la vitamine D. Au-delà d'un délai d'une heure, on ne retrouve jamais de vitamine D dans les surrénales ; en une heure, on en retrouve approximativement le tiers de la quantité injectée, lors d'un essai effectué sur 2 rats ; après trente minutes, on en retrouve, lors de 5 expériences (9rats) des pourcentages encore plus importants.

Dans un de ces derniers essais, les surrénales des 3 rats injectés sont réunies, extraites simultanément et le résidu d'évaporation chromatographié. La fraction éther de pétrole-éther (5 p. - 5 p.) présentant un spectre ultra-violet caractéristique (fig 2) est purifiée par distillation sous vide et fournit 70 μg de vitamine D soit (le rendement de l'opération n'étant pas de 100) sensiblement 80 pour cent du produit injecté (100 μg). L'identification du corps est confirmée par chromatographie sur papier d'une partie de la substance (Rf identique à celui d'une solution témoin de vitamine D_3) et par dosage biologique sur une autre partie immédiatement mise en solution dans de l'huile d'arachide récemment neutralisée : les résultats expérimentaux obtenus sont résumés dans le tableau III et comparés à ceux obtenus à partir d'une fraction de chromatographie d'un animal témoin (Tableau II).

Après 3 semaines, les poulets traités par la vitamine D_3 et l'extrait surrénalien sont normaux alors que les témoins sont rachitiques. Si l'on exprime en vitamine D_3 l'activité antirachitique de l'extrait, on obtient une valeur égale aux quatre cinquièmes de celle fournie par spectrophotométrie après distillation, soit 56 μg retrouvés dans les 6 surrénales après injection de 100 μg ou encore, en évaluant à 10 pour cent la perte à la distillation, 60 pour cent de la quantité injectée.

D'autre part, à côté ou à la place de la vitamine D, on peut mettre en évidence dans les extraits obtenus, 1 heure et surtout 2 et 4 heures après injection de vitamine D_3 , tant à dose faible qu'à dose forte, la présence d'une substance absorbant dans l'ultraviolet (maximum d'absorption à 250 mμ) et donnant la réaction de PESEZ. Cette substance, non cétonique, n'a pu être autrement caractérisée.

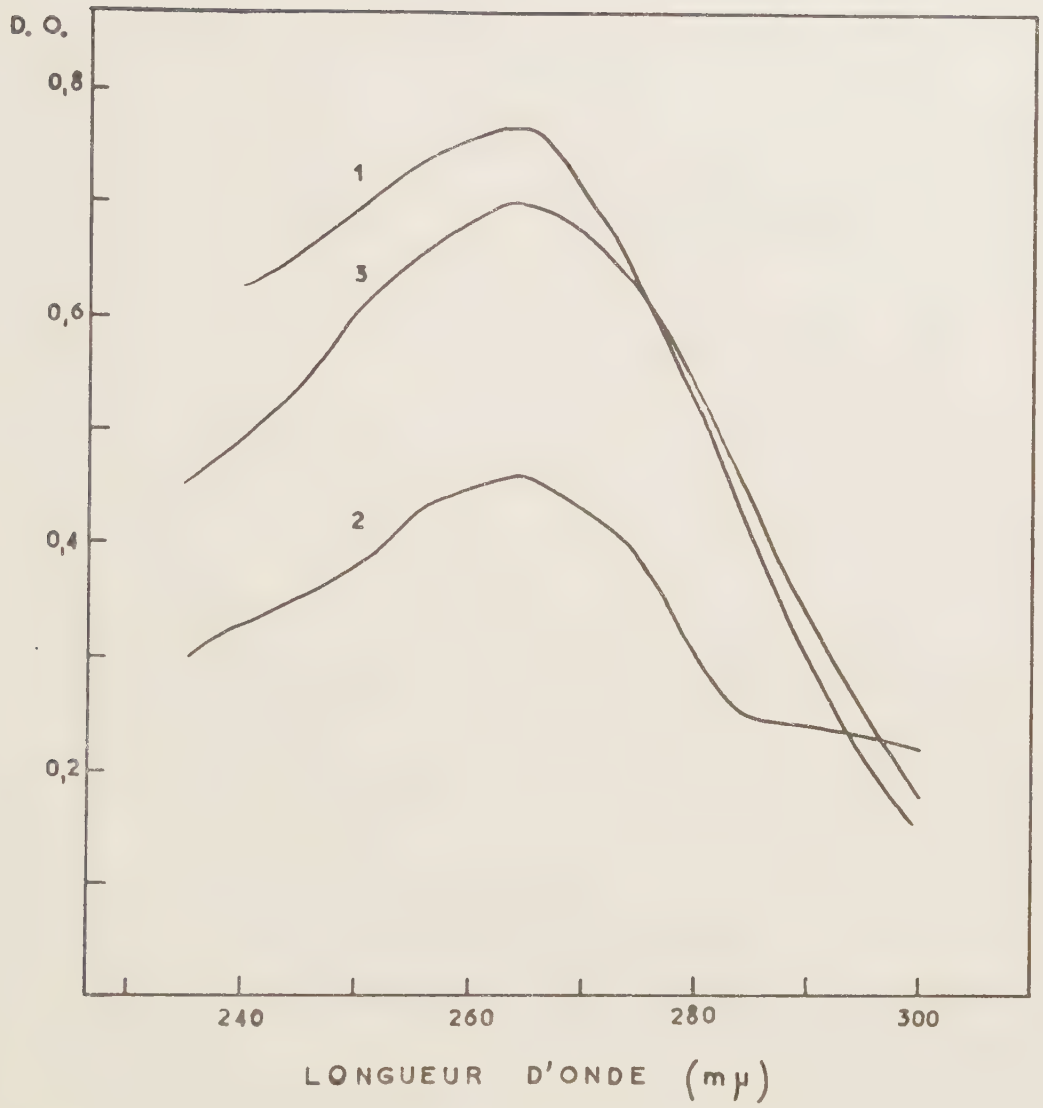


Figure 2 - Spectres d'absorption de la vitamine D_3 et d'extraits surrénaliens de rats injectés avec de la vitamine D_3.

1 - Vitamine D_3 pure en solution dans l'éther éthylique
2 - Fraction de chromatographie éther de pétrole-éther (5p. - 5p.) en solution dans le même solvant.
3 - Fraction de chromatographie éther de pétrole-éther (5p. - 5p.) en solution dans le même solvant, après distillation sous haut vide (90° C - 7,6. 10^{-3} mm Hg)

Nota : La comparaison des spectres ne peut être que qualitative, les quantités de substance contenues dans la cuve du spectrophotomètre n'étant pas identiques.

TABLEAU II

Action sur le rachitisme expérimental du poulet
d'un extrait surrénalien du rat témoin

Traitement	Poids pourcentage d'augmentation	Cendres p. 100	Indice de GUERILLOT-VINET**	Calcémie mg/100ml
Témoins carencés (6)	251	31,5	0,27	8,1
Témoins : 1 UI traités : (5)	309	40,7	0,20	8,9
par : 2 UI Vit. D_3 : (4)	318	33,9	0,20	9,9
Extrait * (4)	201	33,7	0,31	8,4

(·) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de poulets par groupe
* La fraction de chromatographie choisie pour l'essai est celle présentant la densité optique la plus élevée.
** Indice $\geqslant$ 0,30 chez les animaux rachitiques
Indice $\leqslant$ 0,20 chez les animaux normaux ou guéris

TABLEAU III

Action sur le rachitisme expérimental du poulet
d'un extrait surrénalien de rats traités par la vitamine D_3
(33 μg par rat par voie intraveineuse, 30 minutes au préalable)

Traitement	Poids pourcentage d'augmentation	Cendres p. 100	Indice de GUERILLOT-VINET *	Calcémie mg/100ml
Témoins carencés (4)	159	29,9	0,30	7,3
Témoins : 2 UI traités : (5)	247	37,5	0,17	8,8
par : 4 UI Vit. D_3 : (4)	219	41,2	0,17	9,6
Extrait (5)	223	39,7	0,17	9,0

() Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de poulets par groupe
* Indice $\geqslant$ 0,30 chez les animaux rachitiques
Indice $\leqslant$ 0,20 chez les animaux normaux ou guéris

Dans le cas du foie, après 30 minutes, 2, 4 ou 8 heures, on ne retrouve jamais de vitamine D_3 chez les animaux ayant reçu 40 μg de vitamine. Après injection de 85 ou 170 μg, on en retrouve mais en faible proportion (7 à 15 pour cent). Cependant ces résultats doivent être examinés avec la plus grande prudence car les isolements, voire les extractions, n'ont été opérés qu'une vingtaine d'heures après la mort de l'animal. Or, on a vu la fragilité de ce composé dans les surrénales, même conservées à -20° C, ce qui a d'ailleurs nécessité le traitement sans délai de ces glandes. Il est donc fort probable que les teneurs hépatiques réelles sont bien plus élevées que celles trouvées.

Les résultats obtenus avec de la vitamine D_3 de synthèse sont rassemblés dans le tableau IV.

b) Vitamine D_3 d'origine naturelle : Avec la vitamine D_3 d'origine naturelle purifiée par cristallisation du dinitrobenzoate puis saponification, on ne retrouve ni vitamine D, ni métabolite après 30 minutes comme après 120 minutes dans les surrénales : les spectres ultraviolets comme l'essai biologique des différentes fractions de chromatographie sont négatifs.

c) Vitamine D_3 marquée (Tableau V) : Son injection (40 μg/ 210g) à deux rats Wistar adultes, dans les mêmes conditions, permet de retrouver après 30 minutes une quantité faible de tritium, en valeur absolue, dans les glandes surrénales ; la concentration y est cependant bien supérieure à celle du foie (X 5).

*
* *

TABLEAU IV

Pourcentages de vitamine D_3 de synthèse retrouvés
dans les surrénales (S) et le foie (F) de rats
de 30 mn à 8 h après injection intraveineuse de cette vitamine

	Délai :		30 mn	1 h	2 h	4 h	8 h
Dose injectée	40 µg	S	60 p. 100	30 p. 100	0	0	0
		F	0		0	0	0
	85 µg	S			0	0	
		F			7 à 15 p. 100		
	170 µg	S			0		
		F			7 à 15 p. 100		

Le chiffre 0 correspond éventuellement à des quantités indosables de l'ordre de quelques microgrammes.

TABLEAU V

Répartition du Tritium chez le rat
30 mn après injection de vitamine D_3 marquée (40 µg/210g)

Organe	Type d'extraction	Concentration c.p.m./ g *		Pourcentage de la quantité injectée	
		Rat 1	Rat 2	Rat 1	Rat 2
Foie	$CH\ Cl_3$	4.600	5.100	56	48
Reins	"	80	140	0,2	0,3
Surrénales	$(C_2H_5)_2\ 0$	36.300	17.500	1,4	0,8
Plasma	" après saponification	# 160	# 100	1,5	1
Cerveau	$CH\ Cl_3$		0		0

* c.p.m./ g = coups par minute par gramme de tissu frais

ETUDES IN VITRO

Le déplacement du spectre ultraviolet de 265 à 250 mμ si souvent observé in vivo nous a conduit à tenter d'éclaircir le problème d'une autre manière : nous avons recherché si une telle transformation ne pourrait se manifester aussi in vitro par incubation de surrénales de rats à 37° C dans du liquide de RINGER bicarbonaté, en présence de vitamine D 3.

I — TECHNIQUE

L'incubation de quartiers de surrénales a servi à l'étude de la biosynthèse des stéroïdes ainsi qu'à l'analyse de l'action de l'A.C.T.H. La méthode a été détaillée par SAFFRAN (115). Nous-même avons, après incubation, utilisé schématiquement la technique décrite à l'occasion des études in vivo : extraction éthérée, isolement par chromatographie sur colonne d'alumine, caractérisation par spectrographie, colorimétrie, chromatographie sur papier.

Les animaux employés sont des rats Wistar mâles *, maintenus au minimum un mois au laboratoire dans des conditions constantes d'alimentation (Ratigène **) et de température (23° à 25° C), de poids compris entre 180 et 210 grammes.

Réactifs

Incubation : - Vitamine D 3 *** maximum d'absorption (éther éthylique) = 265 mμ

$E \begin{matrix} 1\,\% \\ 1\,cm \end{matrix} = 485$

- Liquide de RINGER bicarbonaté (15)
- Propanediol - 1,2 (propylène glycol)

Extraction : - Verre en poudre fine
- Ether éthylique privé de peroxydes

Isolement : - Alumine MERCK
- Ether de pétrole type "Chemin de Fer"

Caractérisation :

} Voir ci-dessus

---

* Eleveur : Centre d'Elevage d'Animaux de Laboratoire d'Ardenay (Sarthe)

** Alimentation Equilibrée, Commentry (Allier)

*** MERCK 1231 191 . La vitamine de ce lot se retrouve après 30 minutes dans les surrénales.

Protocole opératoire

1) Etudes préparatoires :

Pour une étude in vitro, le solvant de dispersion ne doit pas présenter de spectre ultraviolet risquant de masquer celui de la vitamine D. CHIU (12) se servait pour les stéroïdes surrénaliens de propylène glycol dilué avec de l'eau. C'est ce solvant que nous avons choisi après contrôle de ses propriétés : l'extractum éthéré de liquide de RINGER bicarbonaté additionné de propylène glycol, après lavage à l'eau distillée, ne présente aucun maximum d'absorption entre 240 et 300 mμ.

Pour disperser la vitamine D, nous en pesons 1,5 mg dans une fiole jaugée de 5 ml. Après dissolution dans deux gouttes d'éther et addition de 0,2 ml de propylène glycol nous étendons en agitant par environ 2 ml de liquide de RINGER et chassons l'éther sous vide. Nous notons alors une floculation partielle de la vitamine (déjà constatée par FESTENSTEIN (33) pour l'ergostérol) avec adsorption sur les parois de verre. Nous complétons ensuite à 5 ml avec du liquide de RINGER en agitant fortement.

Etant donné la floculation observée et l'adsorption consécutive, il est évident que seule une partie de la vitamine est réellement dispersée. Son extraction à partir du milieu d'incubation final permet de retrouver 47 μg (dosage spectrophotométrique en déduisant l'absorption de base due au solvant) sur les 180 μg théoriques. Ce chiffre concorde avec celui obtenu par dosage colorimétrique (réactif de CARR et PRICE) : 43 μg. Après conservation 8 h à + 5° C, le pourcentage retrouvé diminue légèrement. Après 1 h à 37° C, la vitamine D se détruit : le pourcentage retrouvé, nul pour des quantités voisines de 20 μg dans 1,5 ml de liquide de RINGER, augmente pour des quantités supérieures, aussi employons-nous finalement des quantités supérieures à 40 μg.

La chromatographie sur alumine après extraction éthérée de la dispersion maintenue 1 h à 37° C permet de constater l'existence d'une nette absorption ultraviolette dans les fractions éther de pétrole et éther de pétrole-éther (5 p. - 5 p.) sans maximum entre 240 et 300 mμ. La fraction éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.) qui élue habituellement la vitamine D présente un maximum à 265 mμ. Par suite de l'existence d'une absorption de base, la densité optique observée correspond au plus à 20 μg de vitamine D sur les 90 μg théoriquement et sur les 50 μg pratiquement en dispersion. L'absorption constatée avec les autres éluats est probablement due aux produits de destruction de la vitamine D.

2) Incubation

Après sacrifice de l'animal, les capsules surrénales prélevées et pesées sont déposées sur un papier filtre imbibé de liquide de RINGER, placé dans une boîte de PETRI ; elles sont coupées en quatre fragments qui sont alors introduits dans deux fioles de WARBURG renfermant chacune 1,5 ml de liquide de RINGER. Les fioles sont agitées 30 minutes à 37° C de façon à éliminer, par cette période de préincubation une substance qui interfère en lumière ultraviolette, mise en évidence par SAFFRAN (115). Pendant ce temps, le liquide solvant ou la dispersion de vitamine D est préparé. Le milieu est alors éliminé par aspiration et remplacé par du liquide de RINGER frais et par le solvant ou la dispersion.

3) Extraction - Isolement

Après une heure d'agitation à 37° C, l'une des fioles est mise de côté. Le milieu d'incubation prélevé ainsi que les liquides de rinçage des fragments de glandes (environ 1,5 ml de liquide de RINGER), sont extraits par trois fois à l'éther en ampoule à décantation. Les solutions éthérées réunies, lavées par deux fois sans agitation sont évaporées sous vide. Après reprise par un volume connu d'éther et détermination du spectre ultraviolet, elles sont évaporées à nouveau ; le résidu, dissous dans un minimum d'éther de pétrole, est chromatographié sur un gramme d'alumine. Les éluats sont examinés par spectrographie dans l'ultraviolet.

Les fragments de surrénales, eux, sont broyés avec de la poudre de verre, puis extraits par la technique utilisée pour les essais in vivo.

4) Caractérisation

Spectrographie dans l'ultraviolet, chromatographie sur papier, réactions colorées de PESEZ et de CARR et PRICE doivent permettre la caractérisation de la vitamine ou d'un métabolite de structure chimique voisine.

II – RESULTATS EXPERIMENTAUX

A/ Incubation témoin

En l'absence de vitamine D, l'extrait brut comme les éluats de chromotographie du milieu présentent des spectres ultraviolets "descendants" ou bien avec épaulement entre 250 et 255 mμ.

La réaction de PESEZ effectuée sur les éluats éther de pétrole et éther de pétrole-éther (5 p. - 5 p.) concentrés sous vide, transvasés en tube à hémolyse et évaporés à sec sous courant d'azote est négative.

La chromatographie sur papier des éluats éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.) concentrés et évaporés dans les mêmes conditions ne permet, après révélation par le réactif de CARR et PRICE, de déceler aucune trace de vitamine D. Ce réactif, bien que moins sensible et moins spécifique que celui de PESEZ, fournit des résultats quantitativement plus en accord avec ceux obtenus par spectrophotométrie : l'intensité de coloration de la tache est comparée à celle obtenue avec des quantités connues de vitamine D chromatographiées parallèlement.

Les spectres obtenus avec les extraits de surrénales sont aussi peu caractéristiques. Effectuée sur le chromatogramme, la réaction de PESEZ est négative de même que la réaction de CARR et PRICE ; nous décelons uniquement un produit non identifié : tache rose de Rf : 0,59 (Rf de la vitamine D : 0,70).

B/ Incubation avec vitamine D_3

Le spectre ultraviolet de l'extrait éthéré brut du milieu présente un maximum d'absorption mais décalé, par rapport au spectre de la vitamine D pure, vers les petites longueurs d'onde (255 à 250 mμ selon la quantité de vitamine D présente). La révélation du chromatogramme sur papier d'un tel extrait permet de caractériser la vitamine D_3 accompagnée d'un corps à l'état de traces donnant la réaction de PESEZ et de Rf : 1.

La réaction de PESEZ effectuée sur les éluats éther de pétrole et éther de pétrole-éther (5 p. - 5 p.) en tube comme sur papier est négative.

La fraction éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.) présente une absorption importante avec maximum à 265 ou à 260 mμ selon la concentration du milieu en vitamine D. En retranchant pour chaque longueur d'onde la densité optique d'une fraction témoin de

celle de la fraction provenant du milieu "vitaminé", nous retrouvons le spectre de la vitamine D (environ 30 μg soit 10 pour cent de la quantité initiale) (fig. 3). La chromatographie sur papier confirme la présence de la vitamine D_3 (Rf : 0,68) ; le chromatogramme est révélé par le réactif de CARR et PRICE. Aucun composé de Rf supérieur à celui de la vitamine D, que l'on pourrait rapprocher du corps absorbant à 250 mμ décelé in vivo et dont le spectre caractéristique pourrait être masqué par celui de la vitamine, ne peut être mis en évidence in vitro.

Les spectres obtenus avec les extraits de surrénales sont atypiques. Par chromatographie sur papier de la fraction éther de pétrole-éther (9 p. - 1 p.) nous ne décelons pas de vitamine D_3, mais tout au plus, comme dans le cas des surrénales témoins, une tache rose de Rf nettement inférieur à celui de la vitamine D_3.,

Dans les conditions détaillées ci-dessus, en présence de glandes surrénales nous retrouvons comme seul séco-stéroïde, dans le milieu d'incubation, la vitamine D_3 introduite au départ. A 37° C, la vitamine se détruit de façon identique en présence ou non de tissu surrénalien et elle ne s'accumule pas dans ces glandes. Cette destruction permet de supposer que si elle se transforme transitoirement en un corps présentant un maximum d'absorption à 250 mμ, celui-ci se détruit au fur et à mesure de sa formation et ne peut être décelé par la méthode décrite.

*

* *

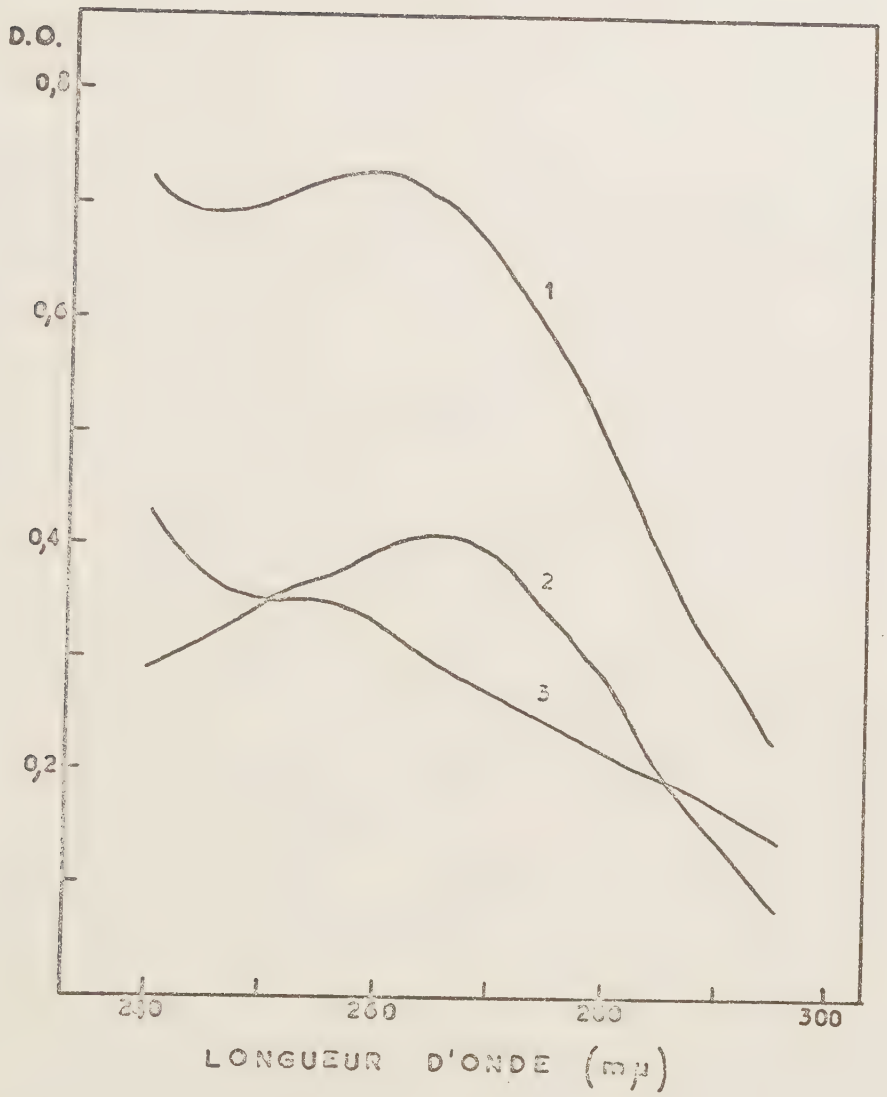


Figure 3 - Spectres d'absorption de fractions de chromatographie préparées à partir de milieux d'incubation de surrénales de rats.

1 - Fraction éther de pétrole-éther (9p. - 1p.) de milieu vitaminé
3 - Fraction éther de pétrole-éther (9p. - 1p.) de milieu témoin
2 - Spectre 3 - Spectre 1 : on caractérise ainsi la vitamine D_3 présente

DISCUSSION

Les résultats obtenus par injection de vitamine D 3 marquée au tritium confirment totalement ceux obtenus par KODICEK et coll. (66) avec une vitamine marquée au carbone 14. La comparaison des pourcentages retrouvés dans différents organes 30 ou 20 minutes après injection fournit les chiffres suivants :

TABLEAU VI

Pourcentage de la dose de radioélément injecté sous forme de vitamine D 3 , retrouvé dans différents organes

	^{3}H (après 30 mn)	^{14}C (après 20 mn)
Foie	52	54
Surrénales	1,1	1,3
Reins	0,25	0,3

La quantité retrouvée dans ces conditions au niveau des surrénales est bien plus faible que dans le cas de la vitamine D3 non marquée. Cependant, si nous prenons pour unité le poids des surrénales, celui du foie est de 2 à 300. Or nous retrouvons dans le foie cinquante fois plus de vitamine D. La concentration surrénalienne est donc au moins 4 à 6 fois plus grande. L'étude de la publication de COPPENS montre qu'il devait l'estimer égale à 3 à 5 fois celle d'autres organes analysés.

Les recherches sur le métabolisme de la vitamine D se poursuivaient parallèlement aux nôtres et après la publication de notre première note, KODICEK (65) reprenait son propre travail avec de la vitamine D 2 marquée au carbone 14 mais en diminuant les doses : 10 μg au lieu de 1 mg ; l'auteur considérait cette dose comme physiologique car il retrouvait alors dans le foie, une teneur de l'ordre de grandeur de celle retrouvée dans le foie de rats rachitiques irradiés par des rayons ultraviolets. Per os, après 24 heures, la répartition était sensiblement la même chez le rat rachitique et chez le rat normal, avec 10 μg et avec 1 mg. Dans les surrénales, par autoradiographie, il retrouvait le carbone 14 spécifiquement dans la zone fasciculée. 20, 40 minutes ou 5 heures après injection

intracardiaque d'une dispersion dans du sérum de rat (méthode de dispersion et lieu d'injection différent des nôtres ; la manière de tuer le rat n'est pas signalée) aux doses de 50 et 200 μg la vitamine D_2 se localisait surtout dans le foie (environ 50 pour cent) et, après 20 minutes, pour 1 pour cent dans les surrénales, le pourcentage tombant à 0,2 pour cent après 40 minutes ; de même la vitamine D_3 (70 et 0,7 pour cent) après 30 minutes ; ces chiffres correspondent à ceux que nous-même avons retrouvés avec le radioisotope.

Pour BLUMBERG et coll. (6), après administration per os à des rats rachitiques, la répartition de la vitamine D_2 est proche de celle de KODICEK, de même chez le singe Rhésus. Les auteurs pensent que la concentration surrénalienne n'est pas due à la liposolubilité de la vitamine D mais que c'est la manifestation d'une propriété spécifique de l'organe. Chez le lapin, BUKHIN et GARKINA (8) signalent qu'après 40 jours d'administration per os (23.000 U.I. soit 575 μg au total) la concentration est maximale dans les surrénales (28 U.I./g) alors qu'elle n'atteint que 7,2 U.I./g dans le sang, 6,1 dans les poumons et 2,5 dans le foie.

Depuis cette époque, seul un article de KODICEK (63) indiquant une localisation de la vitamine D dans la partie antérieure de l'intestin grêle du cobaye scorbutique, 5 heures après son injection intracardiaque, présente un certain rapport avec notre travail.

*

* *

CONCLUSION

Il semble donc actuellement établi par nos résultats que la vitamine D atteint des concentrations importantes dans les glandes surrénales. Les valeurs absolues, éventuellement très élevées, que nous avons rencontrées sont plus inconstantes. Différentes interprétations sont possibles :

- Cette localisation élective est fugace ; aussi, en l'absence de mesure continue, ne peut-on en saisir que par hasard le maximum.

- Les variations individuelles sont probablement importantes.

- Le stress auquel sont soumis les animaux au moment de l'injection et du sacrifice modifie certainement le métabolisme de ce tissu glandulaire :

après 9 injections intrapéritonéales d'A.C.T.H., soit 22 Unités en 5 jours, deux rats reçoivent, 3 h 30 après la dernière injection, la vitamine D par voie intraveineuse ; ils sont sacrifiés après 30 minutes. Nous ne retrouvons pas de vitamine dans les surrénales.

- L'utilisation de vitamine D_3 de différentes provenances et dont la structure physique différait probablement (RAOUL, 107) constituait une cause supplémentaire de variation inconnue au départ.

Pour contrôler ces différents paramètres, il faudra à l'avenir, définir encore davantage les conditions d'expérience et parmi elles les animaux, les régimes, les produits administrés, le tout avec une précision qui est loin d'être actuellement réalisée de façon habituelle en physiologie. Une étude statistique dans le temps sur un grand nombre de rats, avec des vitamines de différents lots pourrait déjà éclaircir le problème.

*
* *

2ème PARTIE

INTERRELATIONS SURRENALES - VITAMINE D DANS L'ABSORPTION CALCIQUE

INTERRELATIONS SURRENALES - VITAMINE D DANS L'ABSORPTION CALCIQUE

POSITION DU PROBLEME - RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS *

A/ ABSORPTION GASTRO-INTESTINALE DU CALCIUM

De nombreux facteurs interviennent dans l'absorption intestinale du calcium. Cet alcalîno-terreux est absorbé plus particulièrement à la partie supérieure de l'intestin grêle puis, en moindre quantité, au niveau de l'iléon terminal et du côlon : là, il se présente essentiellement sous forme de sels insolubles. Simultanément, il s'opère un processus inverse constitué par une perte de calcium endogène, sans doute par les sécrétions intestinales et qui se poursuit lorsque les apports sont réduits.

On peut supposer que l'intestin a une fonction homéostasique vis-à-vis du calcium ; l'excrétion rénale ne peut être le seul mécanisme régulateur : le calcium filtré par le glomérule est en grande partie réabsorbé au niveau des tubes contournés, car toute augmentation marquée de la calciurie peut entraîner la précipitation de calcium insoluble d'où calcinose rénale ou formation de calculs. L'hypercalciurie serait donc prévenue lorsque les apports sont élevés par la fixation rapide squelettique ou par l'élimination digestive selon que l'on est en présence d'un organisme en croissance ou adulte.

Le calcium est apparemment absorbé sous forme ionisée. Un organisme normal semble répondre à l'ingestion d'un sel calcique alcalin par une augmentation de débit de son suc gastrique (HARRIS, 48). Cette absorption est inversement proportionnelle à l'âge, elle dépend de l'état du squelette, de la concentration en ions calciques du contenu intestinal. Il semble exister, au moins partiellement, un processus actif pouvant opérer le transfert contre un gradient de concentration. Peut-être le facteur diffusion intervient-il aussi. Les modalités peuvent d'ailleurs différer selon l'espèce animale. Ainsi KIMBERG et coll. (59) démontrent l'existence d'un transport actif chez le rat et le lapin dans le premier

* On trouvera une bibliographie détaillée dans les mises au point de IRVING (54) et de RASMUSSEN (110).

cinquième de l'intestin grêle alors qu'il est plus marqué au niveau de l'iléon chez le hamster ; ainsi CRAMER et DUECK (20) observent une saturation du mécanisme de transfert chez le chien et non chez le rat, le rythme jéjunal d'absorption restant constant chez le premier lorsque la concentration dépasse 12,5 mM.

Chez l'homme adulte, les échanges quantitatifs journaliers, au niveau du tractus digestif peuvent se schématiser ainsi :

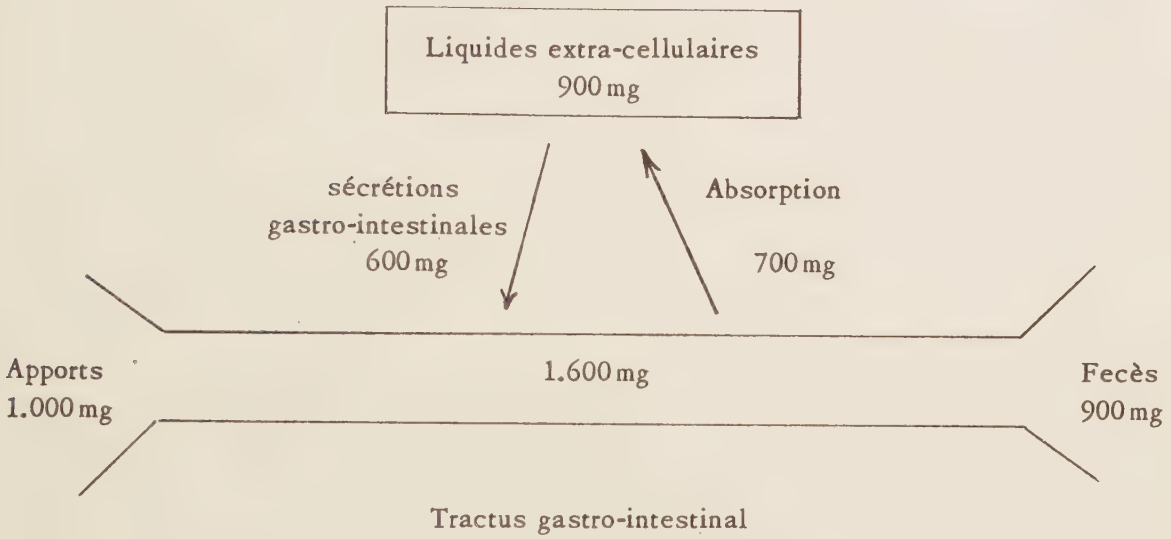


Figure 4

Echanges calciques gastro-intestinaux (d'après RASMUSSEN, 110).

L'absorption est facilitée par un certain nombre de facteurs :

- un milieu acide qui solubilise le calcium
- les vitamines D, dont nous reparlerons ultérieurement
- la parathormone, en présence de vitamine D
- la gestation
- un régime hypocalcique
- un régime riche en protéine ou l'absorption simultanée de certains acides aminés indispensables
- la présence dans le régime de certains oses, dont le lactose (FOURNIER,35), qui entraîneraient peut-être la formation de complexes ose-Ca^{++} empêchant la précipitation du calcium en jouant eux-mêmes le rôle de transporteurs. (10).

- l'oestradiol

D'autres facteurs la diminuent :

- un milieu alcalin
- un excès de lipides dans le contenu intestinal, les acides gras formant des savons insolubles avec le calcium
- un excès d'oxalate
- un excès de phosphate, principalement sous forme de phytates insolubles
- les corticostéroïdes dans certaines conditions et chez certaines espèces animales
- l'hormone somatotrope (34)

B/ INTERRELATIONS SURRENALES - VITAMINE D

Depuis la découverte de la vitamine D dans les graisses animales, on a cherché à préciser son action, à en expliquer les mécanismes biochimiques et physiologiques. Les premières observations sur l'augmentation de l'absorption intestinale du calcium par cette vitamine sont dues à SCHABAD (117) à l'aide de l'huile de foie de morue. Cependant, en raison de l'excrétion intestinale du calcium endogène, ce n'est qu'une trentaine d'années plus tard que les recherches de NICOLAYSEN (93) confirmèrent cette action primaire de la vitamine. L'effet s'en manifeste dans des sacs intestinaux, in situ, chez le rat (94) comme chez le poussin (141,143) aussi bien qu'in vitro (sacs isolés),ainsi que l'ont démontré SCHACHTER et ROSEN (119) d'une part, HARRISON et HARRISON (50) de l'autre.

In vitro, le calcium est transféré de la muqueuse à la séreuse de l'intestin grêle contre un gradient de concentration. Pour SCHACHTER et coll. (118), la vitamine D stimule le transport actif du calcium, pour HARRISON et HARRISON (50), elle favorise aussi, sa diffusion à travers la paroi. De toute façon, son addition, in vitro, dans un sac est totalement inefficace chez le rat comme chez le poussin (136, 14). In vivo, l'existence d'un temps de latence de plusieurs heures dans son action est maintenant bien établie (14, 76, 85,118,141). Il peut être réduit par l'emploi de doses élevées (118). Quatre heures après administration orale, la teneur de la paroi de l'intestin grêle est bien supérieure à celle retrouvée après 48 heures alors que l'intensité d'action varie en sens inverse (118). Ceci peut signifier qu'un certain délai est essentiel à la transformation de la vitamine D en une forme active ou que son action est due à la synthèse d'un corps inconnu et indispensable à une absorption calcique optimale. Considérant l'augmentation d'activité vis-à-vis du transport calcique obtenue chez le poussin par introduction dans le cycle B ouvert de la vitamine D de 2 atomes d'hydrogène (avec formation d'AT 10), SALLIS et HOLDSWORTH (116) envisagent une modification de ce cycle dans l'organisme vivant ; Ils rappellent à ce propos les travaux de RAOUL (102) conduisant à la préparation de diols antirachitiques

(- OH en 19 et en 7) : les oxydations, réductions, transformations céto-enoliques possibles permettraient au transporteur de fixer et de libérer le calcium au point voulu. Or s'il est un tissu riche en enzymes capables de modifier les cycles C ou D d'un stéroïde, c'est bien le tissu surrénalien. Cependant, la 11 « hydroxyvitamine D 3 synthétisée par VELLUZ en 1961 (139) est inactive biologiquement chez le rat.

Chez des rats maintenus à un régime alimentaire courant, selon KIMBERG et coll. (59), il y a transport actif du calcium dans le seul premier cinquième de l'intestin grêle alors qu'après une période de carence calcique, c'est la totalité de l'intestin grêle qui est capable de le transférer contre un gradient de concentration. Cette accumulation à l'intérieur de sacs retournés stimulée par la moindre richesse en calcium du régime n'est marquée qu'en présence de vitamine D. La stimulation persiste, elle serait même plus importante, chez des rats adultes surrénalectomisés : KIMBERG en déduit que la surrénalectomie ne prévient pas l'adaptation à la teneur en calcium de la ration ; les rats n'étant pas carencés en vitamine D, on pourrait conclure que l'action de la vitamine D sur le trnsport actif du calcium n'est pas contrecarrée par la surrénalectomie et que les capsules surrénales n'ont, contrairement à notre hypothèse, aucune place dans le métabolisme de la vitamine, du moins vis-à-vis de son action intestinale. Cependant, il faut penser que dans ces expériences, KIMBERG travaille sur des animaux non carencés ; or, en 12 jours, il est certain que le rat n'a pas épuisé le stock de vitamine absorbée avant l'opération et éventuellement transformée dans les surrénales.

A la suite de nos premiers travaux, SALLIS et HOLDSWORTH (116) ont cherché à préciser les rapports entre surrénales et vitamine D chez le poussin : le choix de cet animal repose sur la facilité d'obtention du rachitisme. Selon le nombre d'injections de cortisol (ou de désoxycorticostérone) précédant la mesure de l'absorption calcique, la vitamine D 3 étant administrée 16 heures avant cette mesure, les résultats diffèrent totalement. Si une administration pendant trois jours consécutifs est antagoniste, une unique injection intracardiaque une heure avant l'expérience est synergique de la vitamine D ; on ne peut donc conclure à un antagonisme structural entre vitamine D et cortisol ou désoxycorticostérone. C'est l'atrophie surrénalienne par administration prolongée de corticostéroïde qui expliquerait l'antagonisme observé ; quant à la cause du synergisme, toujours selon SALLIS et HOLDSWORTH, il faudrait la chercher dans une élévation de sécrétion de substances actives formées par la surrénale à partir de la vitamine D sous l'action du corticostéroïde.

Ne pouvant matériellement surrénalectomiser des poussins rachitiques pour vérifier, dans ces conditions, l'absence d'influence de la vitamine D 3 , les auteurs inhibent alors spécifiquement le cortex surrénalien avec du 1 - (2 - chlorophényl) - 1 - (4 - chlorophényl) 2 - 2 dichloroéthane (O, p - DDD) et obtiennent une absence d'action de la vitamine D. La conclusion de SALLIS et HOLDSWORTH est la suivante : " Le temps de latence précédant une mise en évidence d'un effet de la vitamine D 3 sur l'absorption calcique pourrait bien s'expliquer par la nécessité de concentrer le transporteur dans les cellules de la muqueuse ; notre travail conduit à considérer le cortex surrénalien comme lieu de cette transformation ".

La méthode de démonstration utilisée étant indirecte et par là même critiquable, bien que ne disposant pas de calcium marqué, nous avons tenté sur un animal de surrénalectomie aisée (le rat), d'approfondir le rôle des surrénales, les rapports qu'elles peuvent avoir avec la vitamine D vis-à-vis de l'absorption du calcium. Le choix de cet animal s'imposait d'autant plus que c'est sur lui que nous avions pu montrer la localisation surrénalienne parfois très importante de la vitamine D_3.

TECHNIQUE DE MESURE DE L'ABSORPTION CALCIQUE

A/ MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE

Le choix de l'animal étant fait, nous devions trouver une méthode d'appréciation du calcium absorbé. Nous avions le choix entre quatre groupes de techniques :

- Bilans
- Sacs intestinaux in vivo (in situ)
- Sacs intestinaux in vitro
- Lames intestinales in vitro

Ecartant la méthode des bilans calciques par suite de l'interférence inévitable du calcium endogène excrété dans les fèces, cherchant à respecter au maximum les conditions physiologiques, nous avons opté pour la technique des sacs intestinaux in situ.

Pour réduire les erreurs dans la détermination du calcium restant dans les sacs, il semblait préférable, après un temps donné de prélever le sac, d'en laver l'extérieur abondamment et de doser le calcium dans la totalité du prélèvement, c'est-à-dire dans la paroi du sac et dans son contenu :

> les résultats obtenus avec 4 sacs intestinaux vides prélevés sur 2 rats indiquent une teneur moyenne de 17 μg par sac, soit 400 μg/ g de tissu sec. La teneur en calcium de l'intérieur des sacs est négligeable.

Mais une telle méthode impliquait d'une part la constance de la concentration calcique tissulaire (quel que soit le traitement subi par l'animal, surrénalectomie par exemple), d'autre part la connaissance de la masse tissulaire. De plus, elle nécessitait la calcination à cendres blanches des tissus, aussi avons-nous préféré entraîner le calcium restant dans le sac par du soluté de chlorure de sodium dans une capsule pour l'y doser par la suite.

Dans les expériences préliminaires, nous avons suivi la méthode préconisée par VAUGHAN et FILER (138) : le sac lavé extérieurement est découpé en petits fragments dans une capsule de verre pyrex contenant de l'eau distillée et maintenu pendant 24 heures à +4° C ; le calcium est dosé dans une partie aliquote de la solution séparée

par centrifugation. Les résultats obtenus diffèrent quantitativement de ceux fournis par la méthode finalement choisie, le calcium de la muqueuse diffusant ici dans la solution (fig 5).

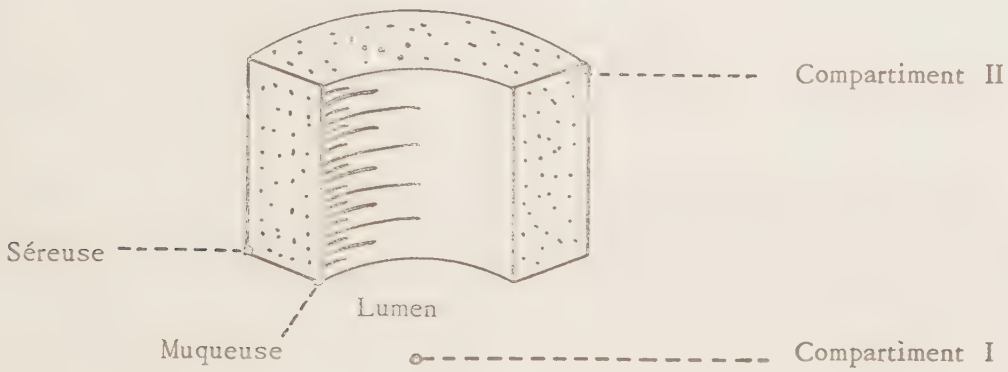


Figure 5 : Représentation schématique d'un fragment de duodénum

Par la méthode de VAUGHAN et FILER, on dose le calcium des compartiments I et II ; par la méthode que nous avons choisie finalement, celui du compartiment I

Dans la méthode de VAUGHAN et FILER, le calcium de la paroi n'est pas tenu pour absorbé ; nous-même tenons compte aussi bien de l'action de la vitamine D sur la fixation par la muqueuse que de celle sur l'effluence du calcium du côté séreux ; par contre, nous considérons nécessairement comme absorbé du calcium qui n'est peut-être qu'adsorbé sur la muqueuse.

La pénétration du calcium dans la paroi intestinale ou, du moins, sa fixation en surface est très rapide :

Nous préparons 3 sacs "duodénaux" de 3 cm de long chacun à partir de l'intestin grêle d'un rat adulte, sacrifié au préalable. Immédiatement après injection de 333 μg de calcium (sous forme de chlorure), nous ne retrouvons que 262 $\mu g \pm 6$ (s_m), soit 79 pour cent. En augmentant la quantité injectée, le pourcentage récupéré est supérieur (89 pour cent avec 415 μg). Un autre essai avec 2 sacs "iléaux" permet de retrouver 94 pour cent de la quantité injectée (268 μg).

Pour préciser le nombre d'animaux à utiliser dans chaque essai, nous appliquons la méthode à 4 rats. Les 4 sacs duodénaux prélevés 1 heure après injection de 200 μg de

calcium ne renferment plus que 5,6 $\mu g \pm 2,1$ (s_m) de calcium. Les variations individuelles constatées rendent nécessaire une interprétation statistique des résultats de chaque expérience.

B/ EXPERIENCES PRELIMINAIRES

Pour contrôler la valeur de la méthode, nous avons cherché à retrouver les résultats obtenus par les groupes de FOURNIER (35,36), LENGEMANN (73,75,144) et VAUGHAN (138) concernant le rôle favorable de certains glucides, dont le lactose, sur l'assimilation du calcium.

1) Réactifs

- chlorure de sodium : solution aqueuse à 9 mg/ml
- chlorure de calcium : solution aqueuse à 5 mg/ml soit 1.800 μg/ml de Ca^{++}
  quantité à injecter : 270 μg de Ca^{++} (0,15 ml)
- lactose : solution aqueuse à 100 mg/ml de la solution précédente

Le pH des solutions précédentes est égal à 5.

2) Protocole opératoire

Les expériences décrites ci-dessous sont exécutées sur des rats Wistar mâles, recevant du ratigène et de l'eau ordinaire, à jeun 24 heures avant l'opération.

Le rat est anesthésié à l'éther et maintenu en décubitus dorsal. Après incision abdominale médiane des enveloppes cutanée, musculaire et péritonéale, l'iléon est dégagé sur 8 cm de longueur à partir du coecum : nous utilisons comme étalon de longueur des repères tracés au préalable sur la peau de l'animal parallèlement à l'incision. Deux sacs égaux sont préparés grâce à 4 ligatures : celles-ci sont pratiquées à la loupe binoculaire * pour éviter toute perturbation dans l'irrigation sanguine des tissus. Nous injectons alors dans chaque sac la solution convenable (0,15 ml) ; le volume a été choisi pour éviter une distension anormale du sac. Le muscle est suturé avec du fil, la peau avec des agrafes métalliques, l'anesthésie interrompue. Au bout d'une heure, le rat est sacrifié, après légère anesthésie à l'éther, par section des carotides, les sacs prélevés, lavés extérieu-

* Technoscope ZEISS

rement à l'eau distillée, placés dans des capsules de verre Pyrex renfermant 1 ml d'eau distillée. Après incision longitudinale, ils sont découpés en petits fragments, pinces et ciseaux étant rincés avec un volume constant d'eau distillée. Après 24 heures à + 4° C et centrifugation, nous dosons le calcium dans une partie aliquote du surnageant joint aux eaux de lavage du culot de centrifugation par la méthode complexométrique de GAUTIER et PIGNARD (38).

3) Résultats

L'utilisation de 2 sacs iléaux par animal permet à chaque rat d'être son propre témoin ; les valeurs obtenues avec 4 sacs au bout d'une heure sont les suivantes :

TABLEAU VII

Teneur en calcium de sacs iléaux témoins (en μg de Ca ++)
1 heure après injection de chlorure de calcium

	Expérience n° 1		Expérience n° 2	
	Rat A	Rat B	Rat A	Rat B
Sac proximal	194	192	151	171
Sac distal	196	202	167	150
Moyenne	195	197	159	160

Nous opérons toujours parallèlement sur 2 animaux, le sac proximal de l'un recevant la même solution que le sac distal de l'autre.

Le lactose introduit dans les sacs iléaux favorise bien l'absorption du calcium ainsi que le montre le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Action du lactose sur l'absorption iléale du Calcium
(μg de Ca^{++} restant dans les sacs après 1 h)

	Calcium	Calcium + Lactose
Sac proximal	161	128
Sac distal	167	128
Moyenne	164	128
Pourcentage absorbé	39	52

Il augmente l'absorption de 13 pour cent. LENGEMANN et COMAR (74) avec des volumes plus importants (1 ml pour un sac de 8 cm de long) obtiennent un accroissement de 12 pour cent,. La méthode est donc valable.

Ces expériences préliminaires nous ayant renseigné sur la possibilité d'utilisation du Calcium 40 à concentration relativement élevée et donc de méthodes classiques de dosage, nous avons adapté la technique au problème particulier que nous désirions résoudre.

C/ TECHNIQUE

Les rats de race Wistar, mâles *, reçoivent à l'âge de 21 jours, un régime privé de vitamine D :

- régime de base de HARRISON, HARRISON et PARKE (51)
- mélange salin de WESSON (145) : $Ca/_P = 1,57$
- mélange vitaminique de PANOS-KLEIN et FINERTY (95).

Si la préparation comporte un brassage important des constituants (cas d'un mélangeur mécanique), il faut prévoir une administration séparée et hebdomadaire de la

* Elevage du Centre de Sélection du C.N.R.S. à GIF sur YVETTE (Seine et Oise)

vitamine A. On évite ainsi sa destruction et l'apparition de symptômes de carence.

En même nombre dans chaque cage, les animaux ont à leur disposition de l'eau ordinaire (eau permutée, 24 heures avant les mesures). Ils sont maintenus à température constante (22 $\pm$ 1° C), dans une animalerie éclairée 12 heures par jour, puis à l'obscurité : aucune différence ne se manifestera d'ailleurs entre les deux méthodes. Les cages, étant installées sur deux niveaux et n'étant pas protégées de la lumière de façon absolument identique, sont journellement interchangées. Les rats sont répartis en groupes et sous-groupes par tirage au sort au moyen d'une table de nombres casualisés.

- Ou bien seuls certains groupes sont carencés en vitamine D, les autres recevant 100 U.I. deux fois par semaine en solution dans 0,1 ml d'huile d'olive neutralisée, puis 1000 U.I., 48 heures avant l'opération (HARRISON avec 1000 U.I. attend 72 heures, SCHACHTER avec 20 U.I., 48 à 72 heures).

- Ou bien tous les animaux sont carencés pendant 21 à 33 jours selon l'expérience et on fait ingérer à certains 1000 U.I. de vitamine D, 48 heures avant l'opération, les autres recevant, bien entendu, le solvant en même quantité.

L'action de la vitamine D se manifeste à tous les niveaux de l'intestin grêle mais est nettement plus marquée sur la première partie (50, 118). Nous choisissons donc le duodénum comme organe test. L'existence d'un point de fixation du mésentère à la paroi postérieure de l'abdomen, approximativement à 4 cm du pylore, ne permet de préparer qu'un seul sac par animal : cette nécessité présente tout de même un avantage : moindre durée de l'opération (10 à 15 mn) donc diminution du choc.

Pour la même raison, nous ne pouvons mesurer la longueur du sac qu'après prélèvement de l'anse : cette longueur se révèle sensiblement constante après un certain nombre d'opérations ainsi que le prouvent les données de la figure 6 rassemblant les chiffres obtenus pour trois expériences différentes. Les sacs dits "duodénaux" utilisés ont donc 3,5 cm de longueur. Le terme "duodénaux" doit être considéré avec prudence car il ne correspond que partiellement à la réalité anatomique : en effet, nous avons vérifié qu'à 3,5 cm du pylore la structure histologique de la muqueuse ne correspond plus au duodénum mais au jejunum. C'est pourtant ce niveau (point de fixation du grêle à la paroi) que des auteurs comme BARRY (4) tiennent pour limite arbitraire du duodénum.

- Réactifs

  - Vitamine D_3 * : $E^{1\%}_{1\,cm}$ = 484 à 265 mμ $[\alpha]^{25}_{D}$ = + 109° (éthanol)
  - Huile d'olive neutralisée (Codex 1949)
  - Chlorure de calcium : solution aqueuse à 1,3 mg/ml (33,5 mM) de calcium métal ajustée à pH 6,5
  - Chlorure de sodium : solution aqueuse à 9 mg/ml

* PHILIPS - DUPHAR, lot MR 434

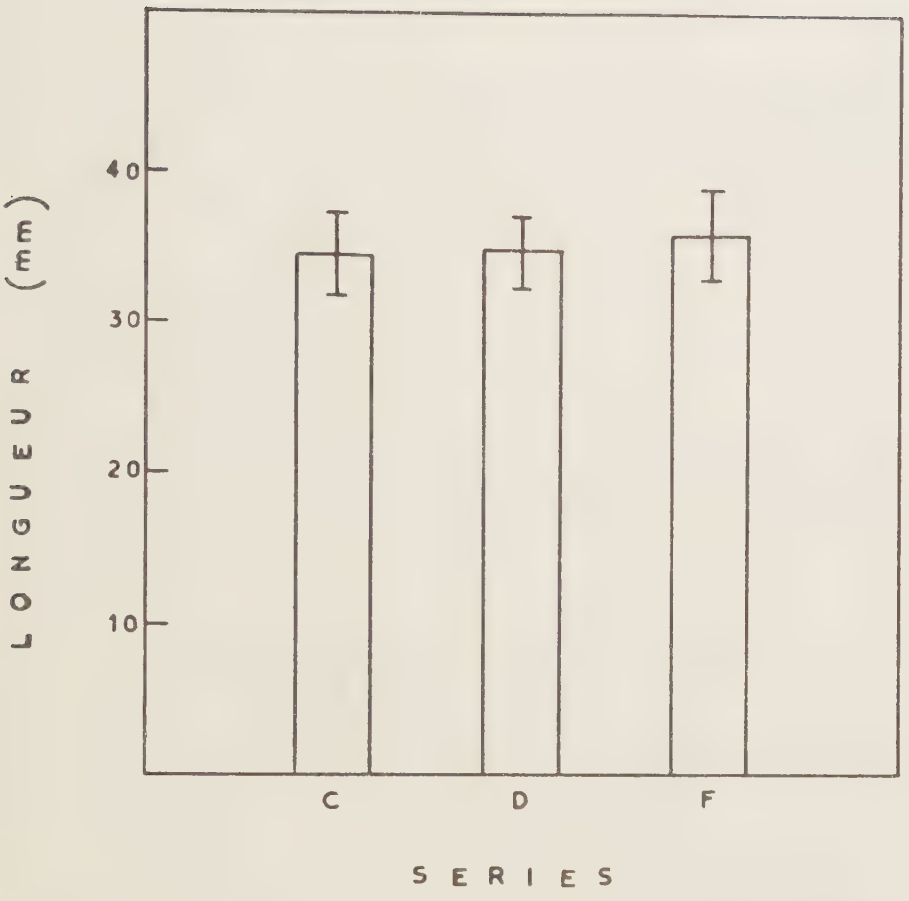


Figure 6 - Regroupement des données de trois expériences, montrant la constance de la longueur des sacs duodénaux de rats.

n = nombre de rats — L = longueur des sacs
s_m = erreur type sur la moyenne — I.C. = intervalle de confiance

Série C n = 23 L = 34,5mm $\pm$ 0,97 (s_m)
I.C. (P = 0,01) = 31,8 - 37,2

Série D n = 27 L = 34,6mm $\pm$ 0,86 (s_m)
I.C. (P = 0,01) = 32,3 - 37,0

Série F n = 17 L = 35,7mm $\pm$ 1,02 (s_m)
I.C. (P = 0,01) = 32,7 - 38,7

- Protocole opératoire

Après 16 à 23 jours de régime et pesée bihebdomadaire *, les rats subissent une première opération. Les surrénalectomies sont pratiquées sous anesthésie à l'éther sur les animaux mis à jeun la veille au soir. L'intervention est exécutée par voie lombaire suivant la technique indiquée par GROLLMAN (45) et le simulacre pour les témoins comprend l'incision de la peau et du muscle. Le taux de mortalité opératoire est pratiquement nul, les animaux faisant une syncope respiratoire étant ranimés par insufflation nasale d'air par l'intermédiaire d'un tuyau de caoutchouc. Les animaux, maintenus au chaud après l'opération, sont privés de nourriture au total pendant 24 heures. Les surrénalectomisés ont à leur disposition de l'eau salée. 8 à 14 jours plus tard, sous anesthésie, on ligature les canaux cholédoques et prépare les sacs duodénaux sur les rats à jeun (cf. expérience préliminaire). La solution tiédie est injectée à l'aide d'une seringue de précision de 0,25 ml de capacité. La quantité de calcium injectée est contrôlée à chaque expérience ; elle est comprise entre 180 et 205 μg (4,5 à 5 μmoles). L'ordre d'opération des rats est déterminé au hasard.

Le sac prélevé une heure plus tard est suspendu par un des fils de ligature à une petite potence, rincé extérieurement avec du soluté de chlorure de sodium. La partie inférieure est alors incisée au-dessus d'une capsule de verre Pyrex. Les ciseaux sont rincés au-dessus de la capsule. L'intérieur du sac est lavé par injections alternées à la partie supérieure de soluté de chlorure de sodium (3 × 3 ml) et d'air.

Incisé longitudinalement et séché superficiellement, le sac est déposé à plat sur un bristol. Sa longueur ainsi que sa surface, sont déterminées, cette dernière par pesée du carton découpé.

Sur la solution évaporée à sec, on dose le calcium par méthode complexométrique. Tous les dosages sont effectués en double. Si la calcination est inutile, la précipitation est, elle, nécessaire (Tableau IX).

---

* L'analyse des courbes de poids individuelles permet d'éliminer des calculs des animaux se comportant de façon aberrante tant par l'évolution de leur croissance que par la valeur de l'absorption calcique.

TABLEAU IX

Dosage complexométrique du calcium sur une solution duodénale

Méthode	Calcium retrouvé en μg
Calcination et précipitation	341
Précipitation	338
Dosage direct	422

La quantité de calcium dosé étant minime, on ajoute pour entraîner la précipitation 40 μg de Ca^{++} par tube.

– Dosage du calcium (Technique de base de GAUTIER et PIGNARD, 38).

Le dosage est un dosage par retour, à l'aide d'une solution titrée du sulfate de Nickel, de l'excès de Complexon III (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique) qui n'a pas fixé d'ions calcium, en présence de murexide comme indicateur coloré.

Précautions générales pour le dosage

La verrerie doit être lavée au mélange sulfochromique et rincée à l'eau distillée.

La solution de complexon est conservée dans un flacon de polyéthylène pour éviter une baisse de son titre par fixation du calcium du verre.

Les tubes utilisés sont en Pyrex pour la même raison.

Réactifs nécessaires

- Acide acétique 0,1 N
- Oxalate d'ammonium 0.1 N
- Complexon III 0,004 M
- Sulfate de Nickel. 7 H_2 0, 0,002 M
- Ammoniaque 15 N
- Murexide diluée au 1/100^e dans du chlorure de sodium pulvérisé
- Chlorure de calcium 200 μg/ml de Ca^{++}. Solution préparée par pesée de 0,2497 g de CO_3 Ca R.P., addition de 9ml de &+1 1/10 puis d'eau distillée pour obtenir 1 litre.

Au moment de la précipitation, le mélange des solutions d'oxalate d'ammonium et d'acide acétique doit être à pH 5,5 (coloration vieux rose au rouge de méthyle). Pour cela, il faut au préalable ajouter de l'ammoniaque à l'oxalate d'ammonium.

Mode opératoire

Les liquides en provenance du sac intestinal sont évaporés à sec à 100° C. Le résidu est repris par 5 ml, exactement mesurés, de solution d'acide acétique et centrifugé. On effectue la précipitation du calcium sur 2 ml du surnageant (additionnés de 0,2 ml de solution calcique), ce qui permet de faire le dosage en double, en tube à centrifuger conique par 0,5 ml de solution d'oxalate d'ammonium. On abandonne une heure les tubes recouverts de lames de verre et centrifuge 10 minutes à 5.000 tours/minute.

On décante le liquide surnageant et laisse égoutter le tube par retournement sur plusieurs épaisseurs de papier filtre. Le précipité d'oxalate est dissous par 0,15 ml d'acide chlorhydrique à chaud. On ajoute 1 ml de complexon III et 0,5 ml d'ammoniaque puis, après deux minutes, une pointe de spatule de Murexide et, à la burette, le sulfate de Nickel jusqu'à coloration jaune champagne.

Soit N' ml utilisés.

Parrallèlement, on standardise la solution de sulfate de Nickel vis-à-vis du Complexon.

Soit N ml utilisés (# 2ml).

La quantité de calcium ajoutée systématiquement est déterminée en utilisant la même pipette.

Soit N '' ml utilisés.

Calculs

- Ca^{++} dans la prise d'essai, en $\mu g = X$

$$X = (N - N') \times \frac{2}{N} \times 40 \times 2$$

- Ca^{++} ajouté comme entraîneur en $\mu g = Y$

$$Y = (N - N'') \times \frac{2}{N} \times 40 \times 2$$

- Ca^{++} dans le sac intestinal en $\mu g = (X - Y) \times \frac{5}{2}$

$$= \left[\frac{N - N'}{N} - \frac{N - N''}{N} \right] \times 160 \times \frac{5}{2}$$

$$= 400 \times \frac{N'' - N'}{N}$$

D/ PROGRAMME D'ANALYSE STATISTIQUE *

Le taux de mortalité est nul pour les animaux ayant subi uniquement un simulacre d'opération. Malheureusement, il n'en est pas de même pour les surrénalectomisés où il a atteint dans certains cas 75 pour cent. Ceci nous a contraint à travailler sur des groupes déséquilibrés au départ pour compenser, avec plus ou moins de succès, cette différence de mortalité. Il importe de noter qu'elle a considérablement diminué du jour où nous avons substitué à la caséine dévitaminée ** du régime une caséine acide précipitée ***.

---

* Les plans choisis ont été sélectionnés dans l'ouvrage de L. LISON : Statistique appliquée à la biologie expérimentale, GAUTHIER-VILLARS, édit., Paris 1958

** Caséine dévitaminée BYLA

*** Caséine acide précipitée BILLAULT

L'absence de substances antirachitiques dans cette caséine a été vérifiée par essai biologique sur le poulet.

Ne pouvant maintenir constant et égal le nombre de rats dans les différents groupes, nous n'avons pu planifier nos essais sous forme d'expériences factorielles 2 × 2 qui auraient permis l'étude de deux facteurs (rats avec et sans surrénales) chacun à deux niveaux (carencés ou non) en révélant les interactions.

Nous avons donc choisi un plan expérimental un peu plus simple avec 4 groupes permettant en conséquence 3 comparaisons simultanées et indépendantes ("orthogonales") par analyse de variance et que l'on peut représenter schématiquement de la façon suivante :

Soit 2 traitements différents 1 = rats témoins (incisés)
2 = rats surrénalectomisés

Les animaux de ces 2 groupes peuvent ou non recevoir de la vitamine D_3 . On obtient ainsi quatre sous-groupes :

11 (rats témoins sans vitamine D_3) et 21 (rats surrénalectomisés sans vitamine D_3)

12 (rats témoins avec vitamine D_3) et 22 (rats surrénalectomisés avec vitamine D_3)

Le 2ème chiffre de chaque sous-groupe correspond donc au traitement vitaminique :

niveau 1 rats sans vitamine D_3

niveau 2 rats avec vitamine D_3

Les comparaisons sont les suivantes :

	Groupes expérimentaux			
Comparaison	11	12	21	22
I Effet de la surrénalectomie	+	+	-	-
II Effet de la vitamine chez les témoins	+	-	0	0
III Effet de la vitamine chez les surrénalectomisés	0	0	+	-

Les signes + et - correspondent aux groupes réunis ou opposés les uns aux autres.

Il aurait été possible de considérer 1 = rats carencés — 11 surrénalectomisés, 12 témoins incisés

2 = rats traités — 21 surrénalectomisés, 22 témoins incisés

et d'étudier les comparaisons :

I Effet de la vitamine D

II Effet de la surrénalectomie chez les carencés

III Effet de la surrénalectomie chez les traités

Mais la première méthode nous a paru plus efficace.

Rappelons brièvement que l'analyse de variance consiste essentiellement à décomposer la variance totale d'un ensemble en variances partielles correspondant à des sources de variation différentes et déterminées. Les variances partielles sont constituées par la variance entre groupes et par la variance à l'intérieur des groupes (correspondant aux variations non contrôlées). Ces variances sont ensuite comparées entre elles au moyen du test F

$$F = \frac{\text{Variance entre groupes}}{\text{Variance à l'intérieur des groupes}}$$

L'expérimentation avec quatre groupes permet une analyse simultanée des résultats ; nous disposons ainsi pour l'estimation des variations non contrôlées d'un plus grand nombre de données (toutes les valeurs disponibles même pour une comparaison ne concernant qu'une partie de ces valeurs) ; pour la comparaison I, de plus, nous opérons sur la totalité des individus.

La variable mesurée (absorption calcique) semble devoir dépendre de la surface du segment intestinal utilisé. D'ailleurs SCHACHTER (118), contrairement à HARRISON (50) exprime le ^{45} Ca transféré en c.p.m./cm^2 d'intestin. Nous-même avons donc mesuré les surfaces et confronté les résultats de nos expériences par analyse de covariance (méthode des Y réduits, 77), c'est-à-dire, en comparant les droites de régression. Aucune amélioration des résultats n'ayant été constatée, nous ne reproduirons aucun exemple de ces calculs, d'ailleurs assez longs. Il semble que l'erreur due aux variations de surface est négligeable par rapport aux variations individuelles dans l'absorption et que, peut-être, la détermination de surface est par elle-même trop imprécise pour un tissu qui possède une élasticité certaine ; il se peut qu'un autre facteur intervienne ainsi que nous le verrons ultérieurement. Dans les paragraphes suivants, nous reproduisons à titre d'exemple les données et calculs de deux expériences.

– Calculs statistiques – Série C

Le tableau X groupe les résultats obtenus. On peut y remarquer la dispersion des données individuelles recueillies et le faible nombre d'animaux dans l'un des groupes : c'est ici que l'analyse statistique présente de l'intérêt et principalement l'utilisation de la totalité des données pour estimer les variations non contrôlées et l'appliquer à la comparaison de deux seulement des groupes.

TABLEAU X

Action de la vitamine D_3
sur l'absorption calcique duodénale de rats témoins ou surrénalectomisés
- vitamine D_3 administrée : 1.000 U.I. per os, 48 heures au préalable
- quantité de Ca^{++} injectée : 180 µg (4,5 µmoles) / sac
- longueur moyenne des sacs duodénaux : 34,5 mm ± 0,97 (s_m)

	Surface cm^2	Quantité de Calcium absorbée			Pourcentage absorbé
		µg	µmoles	µmoles / cm^2	
Tèmoins incisés carencés = 11	4,16	159	3,97	0,95	88,0
	3,52	134	3,35	0,95	74,5
	3,55	156	3,91	1,10	87,0
	3,18	177	4,42	1,39	98,0
Moyennes	3,60	156	3,91	1,09	87,0
Témoins incisés traités = 12	3,19	147	3,69	1,15	82,0
	3,78	177	4,42	1,17	98,0
	3,66	153	3,84	1,05	85,0
Moyennes	3,54	159	3,98	1,12	88,0
Surrénalectomisés carencés = 21	2,82	135	3,36	1,19	74,5
	3,05	157	3,94	1,29	87,5
	2,72	134	3,35	1,23	74,5
	3,77	161	4,02	1,07	89,5
	3,14	163	4,07	1,30	90,5
	2,46	117	2,94	1,20	65,0
	3,03	154	3,84	1,27	85,0
	3,50	129	3,22	0,92	71,5
Moyennes	3,06	143	3,59	1,18	79,5
Surrénalectomisés traités = 22	2,92	166	4,15	1,42	92,0
	2,46	159	3,97	1,61	88,0
	2,69	167	4,17	1,55	92,5
	3,06	161	4,02	1,31	89,5
	2,62	147	3,67	1,40	81,5
	2,53	165	4,12	1,63	91,5
Moyennes	2,71	160	4,01	1,48	89,0

Les abréviations utilisées dans les calculs statistiques sont les suivantes :

X = donnée initiale
$\bar{X}$ = moyenne
n = nombre de données
SX = somme des données
SX^2 = somme des carrés des données
S_x^2 = somme des carrés des écarts sur la moyenne = S.C.
$(SX)^2$ = somme des données au carré
K = nombre de groupes
D.L. = degrés de liberté
C = terme de correction
C.M. = carré moyen = variance
$F_{0,05}$ = valeur critique de F pour la probabilité $P = 0,05$
* = $F > F_{0,05}$; différence significative
** = $F > F_{0,01}$; différence hautement significative

L'analyse de variance est effectuée en prenant pour données initiales les microgrammes de calcium absorbés.

Groupe 11	Groupe 12	Groupe 21	Groupe 22
$SX = 627$	$SX = 479$	$SX = 1148$	$SX = 965$
$SX^2 = 99.215$	$SX^2 = 76.949$	$SX^2 = 166.790$	$SX^2 = 155.481$
$n = 4$	$n = 3$	$n = 8$	$n = 6$
$\bar{X} = 156$	$\bar{X} = 159$	$\bar{X} = 143$	$\bar{X} = 160$

Totaux : $SX = 3.219$ $SX^2 = 498.435$ $n = 21$

$$C = \frac{(SX)^2}{n} = 493.426$$

Variation totale

S.C. = $SX^2 - C = 498.435 - 493.426 = 5.009$

D.L. = $n - 1 = 21 - 1 = 20$

Variation entre groupes

$$S.C. = \frac{(SX_{11})^2}{n_{11}} + \frac{(SX_{12})^2}{n_{12}} + \ldots\ldots\ldots - C$$

$$= 98.282 + 76.480 + 164.738 + 155.204 - 493.426 = 1.278$$

$$D.L. = K - 1 = 4 - 1 = 3$$

Variation à l'intérieur des groupes

$$S.C. = SX^2 - \left[\frac{(SX_{11})^2}{n_{11}} + \frac{(SX_{12})^2}{n_{12}} + \ldots\ldots \right]$$

$$= 5.009 - 1.278 = 3.731$$

$$D.L. = (n_{11} - 1) + (n_{12} - 1) + \ldots\ldots$$

$$= 17$$

TABLEAU XI

Analyse de variance - Série C

Source de variation	S.C.	D.L.	C.M
entre groupes (= Traitements)	1.278	3	426
à l'intérieur des groupes (= Erreur)	3.731	17	219
Total	5.009	20	

$$F = \frac{426}{219} = 1,94 \qquad F_{0,05} = 3,20 \qquad F_{0,01} = 5,18$$

La valeur de F trouvée indique l'absence de différence statistiquement significative entre les différents groupes. On poursuit alors le test en séparant les effets des divers traitements.

Comparaison I

$$S.C. = \frac{(SX_1)^2}{n_1} + \frac{(SX_2)^2}{n_2} - C$$

$$= 174.748 + 318.912 - 493.426 = 234$$

D.L. = 1 (par définition)

Comparaison II

$$S.C. = \frac{(SX_{11})^2}{n_{11}} + \frac{(SX_{12})^2}{n_{12}} - C \qquad \text{ici } C = \frac{(SX_1)^2}{n_1}$$

$$= 98.282 + 76.480 - 174.748 = 14$$

D.L. = 1

Comparaison III

$$S.C. = \frac{(SX_{21})^2}{n_{21}} + \frac{(SX_{22})^2}{n_{22}} - C \qquad \text{ici } C = \frac{(SX_2)^2}{n_2}$$

$$= 164.738 + 155.204 - 318.912 = 1.030$$

D.L. = 1

Le tableau de l'analyse de variance devient maintenant

TABLEAU XII

Analyse de variance - Série C ; décomposition des traitements

Source de variation	S.C.	D.L.	C.M.	F
Comparaison I	234	1	234	1,07
Comparaison II	14	1	14	15,6
Comparaison III	1.030	1	1.030	4,70 *
Erreur	3.731	17	219	
Total	5.009	20		

$F_{0,05}$ pour 1 et 17 D.L. = 4,45

$F_{0,05}$ pour 17 et 1 D.L. = 246

Nous voyons donc que la valeur de F pour la comparaison III est seule significative.

Ainsi que nous pouvons le constater à l'examen du Tableau X les moyennes des groupes 11 et 21 diffèrent assez nettement. Nous pouvons les comparer l'un à l'autre, mais ne pouvons alors disposer de la totalité des données des quatre groupes pour estimer les variations non contrôlées. Une analyse de variance simple sur ces deux groupes conduit à une différence non significative.

- Calculs statistiques - Série F

Nous avons, dans ce cas particulier, administré de la vitamine D en proportion géométriquement croissante à des animaux. L'expérience comporte cinq groupes de rats.

1	Témoins incisés carencés			
2	Surrénalectomisés carencés			
31	"	+	10	U.I. de vitamine D_3
32	"	+	100	U.I. "
33	"	+	1000	U.I. "

Le nombre réduit d'animaux par groupe ne pouvait nous permettre l'étude statistique de la réponse des groupes à des doses différentes, mais nous pouvions espérer :

1° - confirmer les résultats précédents.

2° - voir grossièrement par comparaison des moyennes s'il existe une proportionnalité entre dose et effet.

3° - trouver la dose minima active.

Statistiquement, nous avons comparé :

- les 2 groupes 2 et 3 : Test F significatif
- les 2 groupes 1 et 2 : Test F significatif
- les 3 groupes 1, 2, 3 : selon le schéma suivant

		Groupes expérimentaux	
Comparaisons	Contrôle	Traitement niveau 1	Traitement niveau 2
	1	2	3
I Effet de la surrénalectomie	+2	-1	-1
II Effet de la vitamine D	0	+1	-1

La comparaison I n'offre pas d'intérêt : le groupement de tous les animaux surrénalectomisés diminue bien la variance de l'erreur, mais le fait que la vitamine D compense l'action de la surrénalectomie agit en diminuant celle du poste "traitements". Par contre, pour la comparaison II, par rapport au test simple effectué au préalable (ci-dessus), nous diminuons seulement la variance de l'erreur et le test F nous indique une différence hautement significative alors qu'elle n'était que significative pour la simple comparaison des groupes 2 et 3.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Les résultats obtenus en six expériences, avec une centaine d'animaux, sont regroupés dans les figures 7 et 8. Les rats des séries A et B destinés à recevoir de la vitamine D_3 per os ne sont pas carencés au préalable en cette vitamine ; ces rats non carencés traités constituent les groupes 12 et 22 de ces deux séries. Tous les groupes d'animaux des séries suivantes sont au contraire carencés et maintenus à l'obscurité ; les

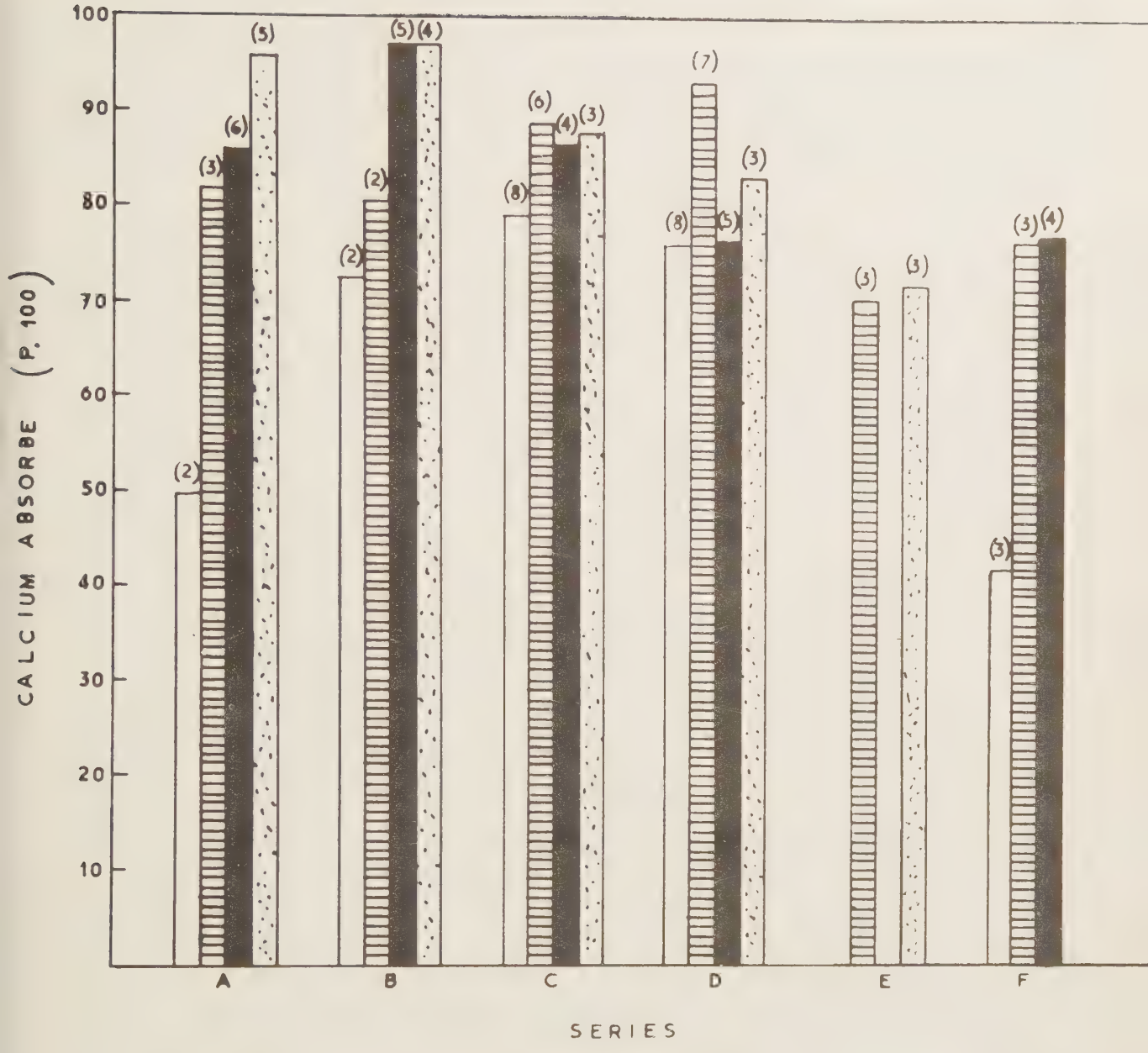


Figure 7 - Action de la vitamine D_3 (1.000 U.I. per os, 48 heures au préalable) sur l'absorption calcique duodénale de rats incisés (témoins) ou surrénalectomisés. Représentation graphique des résultats obtenus avec six séries d'animaux.
L'absorption est exprimée en pourcentage de la dose injectée.
Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats par groupe.

Surrénalectomisés carencés (groupes 21)

Surrénalectomisés traités (groupes 22)

Témoins carencés (groupes 11)

Témoins traités (groupes 12)

groupes 12 et 22 reçoivent de la vitamine D_3 per os dans les mêmes conditions que ceux des séries A et B , c'est-à-dire 48 heures avant la mesure de l'absorption calcique et constituent des groupes de rats carencés traités. Les groupes 11 et 21 sont carencés en vitamine D et n'en reçoivent pas per os : ces rats sont dénommés rats carencés non traités.

A/ RATS TEMOINS

L'absorption calcique duodénale chez les rats intacts et chez ceux ayant subi un simulacre d'opération (témoins incisés) est voisine (Tableau XIII). L'analyse de variance montre que la différence entre les moyennes des deux groupes n'est pas significative ; de même l'analyse de covariance, quand on tient compte des surfaces des anses intestinales.

TABLEAU XIII

Absorption calcique duodénale de rats témoins

	Témoins intacts (3 rats)	Témoins incisés (3 rats)
Quantité de Ca^{++} absorbée en µmoles	$4,7 \pm 0,06$ (s_m)	$4,1 \pm 0,25$ (s_m)

Cette absorption est importante. Elle est comprise entre 70 et 97 pour cent de la quantité administrée (4,5 à 5 µmoles de la solution 33,5 mM). La comparaison des absorptions des témoins incisés ayant ou non reçu, 48 heures avant la détermination 1.000 U.I. de vitamine D_3 per os (groupes 11 et 12) montre que la vitamine favorise apparemment cette absorption, à condition bien entendu, que cette dernière ne soit pas maximale (fig 7). Mais cette action de la vitamine D, n'est pas statistiquement significative dans les conditions de l'expérience.

B/ RATS SURRENALECTOMISES

1) Séries A et B (seuls les rats non traités sont préalablement carencés)

- La vitamine D_3 augmente nettement l'absorption. Les résultats sont

hautement significatifs dans le cas de la série A.

– L'ensemble des animaux surrénalectomisés (groupe 21 + groupe 22) présente une absorption réduite ($P < 0,01$) par rapport à celle de l'ensemble des animaux témoins (groupe 11 + groupe 12).

– La surrénalectomie se traduit par une diminution importante de l'absorption du calcium chez les rats carencés non traités : la différence entre les moyennes des groupes 11 et 21 est hautement significative pour les deux séries.

– La surrénalectomie des rats non carencés et traités diminue aussi l'absorption mais de façon moindre et non significative lorsqu'on l'envisage isolément (groupes 12 et 22).

2) Séries C, D, E et F (tous les rats sont préalablement carencés).

– La vitamine D_3 augmente nettement l'absorption duodénale du calcium . Les différences entre les moyennes des groupes traités ou non sont significatives dans les trois séries où cet essai a été effectué (c'est-à-dire pour les groupes 21 et 22 des séries C, D et F). L'absorption est proportionnelle à la dose selon une progression probablement géométrique (fig 8) : le nombre d'animaux utilisés ne nous permet cependant pas d'affirmer ce point. L'action est déjà marquée avec 10 U.I. de vitamine D_3 .

– La surrénalectomie des rats carencés se traduit deux fois sur trois, par une diminution de l'absorption : la différence est significative dans le cas de la série F.

– L'administration de vitamine D_3 à des rats carencés surrénalectomisés amène l'absorption au niveau de celle des témoins traités (groupes 12 et 22 des séries C et E) et même à un niveau supérieur (série D) mais cette dernière différence n'est pas significative. En d'autres termes, le fait d'administrer de la vitamine D_3 à des animaux surrénalectomisés ne permet plus de distinguer leur absorption de celle de témoins incisés, eux-mêmes traités. C'est ce caractère qui différencie les séries C, D et E des séries A et B.

De ces résultats, nous pouvons tirer certaines conclusions :

Dans nos conditions expérimentales, indépendamment de l'action de la vitamine D_3 , les surrénales agissent sur l'absorption calcique en la facilitant. La vitamine D_3 la favorise, elle aussi, et n'a pas apparamment besoin d'être passée, ni peut-être plus ou moins transformée dans les capsules surrénales. Elle compense, en quelque sorte, la diminution d'absorption que provoque la surrénalectomie.

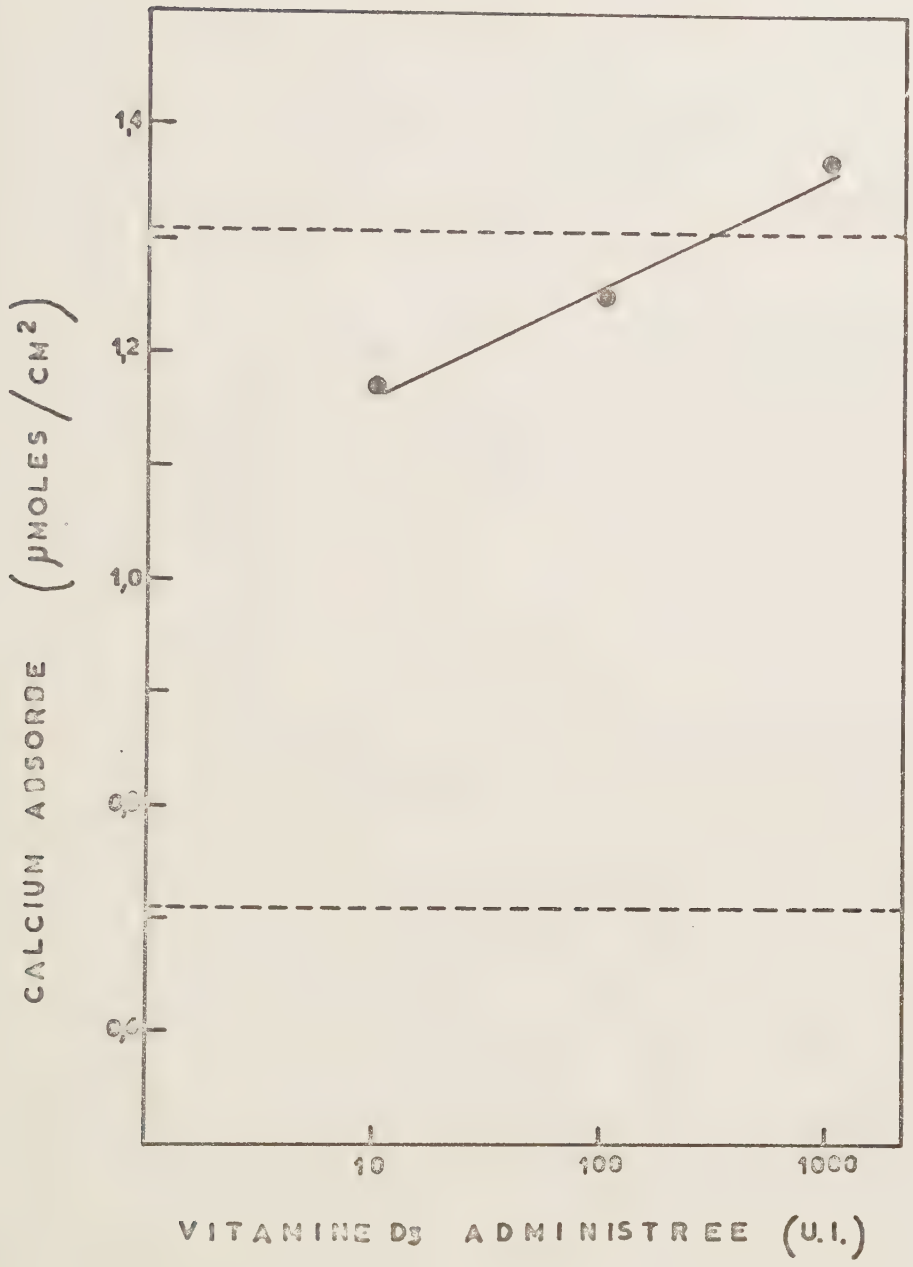


Figure 8 - Action de la vitamine D_3 sur l'absorption calcique duodénale de rats surrénalectomisés. Courbe montrant la proportionnalité entre le logarithme de la dose et l'action observée.

Les deux lignes horizontales (- - - -) correspondent aux niveaux d'absorption des témoins :

- témoins incisés carencés : ligne supérieure
- surrénalectomisés carencés : ligne inférieure

D'autre part, la confrontation des surfaces des sacs intestinaux fait apparaître des différences parmi les animaux surrénalectomisés selon leur état vitaminique final : pour la série C par exemple (Tableau X), alors que la longueur moyenne des sacs est la même (34 mm), la surface est inférieure de 11 pour cent chez les animaux traités. Cette différence, bien que plus ou moins marquée,est toujours notable : elle se manifeste dans toutes les expériences ainsi que le montre le tableau XIV.

Il semblerait donc qu'en 48 heures la vitamine D_3 tende à provoquer une légère involution du duodénum. La comparaison des moyennes par analyse de variance, effectuée séparément pour chaque série, montre que les différences de surface ne sont pas significatives. Cependant cette action se traduit sur l'absorption du calcium : ramenée à l'unité de surface, l'augmentation d'absorption que la vitamine D provoque chez les animaux surrénalectomisés devient encore plus significative ainsi qu'on peut le constater à l'examen du tableau XV et de la figure 9.

TABLEAU XIV

Réduction de la surface duodénale par administration de 1.000 U.I. de vitamine D_3 per os 48 heures au préalable

Série	A	B	C	D	F
Surrénalectomisés carencés	320 (2)	303 (2)	306 (8)	277 (8)	296 (3)
Surrénalectomisés traités	281 (3)	278 (2)	271 (6)	269 (7)	266 (3)
Réduction de surface (en pourcentage)	12	8	11 ($P < 0,1$)	3	10

Chaque chiffre des lignes 2 et 3 représente la surface moyenne en mm^2 des sacs duodénaux d'un groupe de rats.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats par groupe.

TABLEAU XV

Pourcentages d'accroissement de l'absorption calcique intestinale sous l'action de la vitamine D sur des rats surrénalectomisés

Pourcentages	Séries A	B	C	D	F	Moyennes
Pourcentages absolus	63	8	11	22	83	37
Pourcentages par unité de surface	88	17	25	26	93	49

Rien de tel ne se manifeste chez les rats présentant un simulacre d'opération.

La vitamine D_3 parait agir à la fois sur l'absorption calcique et sur la surface des sacs duodénaux chez les seuls animaux surrénalectomisés. Il n'est pas possible de faire intervenir cette surface dans une comparaison simultanée des quatres groupes en ramenant l'absorption à l'unité de surface ou en effectuant une analyse de covariance, puisque le phénomène évolue différemment chez les témoins et chez les surrénalectomisés.

En toute rigueur, il faudrait raisonner non pas sur les surfaces mais sur la valeur obtenue en divisant la surface de chaque sac par sa propre longueur, c'est-à-dire sur la circonférence, surtout lorsqu'on compare les surfaces de deux groupes par analyse de variance donc lorsqu'on fait intervenir les valeurs individuelles. En effet, même si les longueurs moyennes sont les mêmes pour les différents groupes, les écarts des valeurs individuelles sur la moyenne de chaque groupe sont différents dans les deux cas. Nous avons pu faire les calculs dans le cas des séries B, C, D et F. Les réductions de circonférence obtenues sont respectivement de 13, 11, 1 et 11,5 pour cent (au lieu de 8, 11, 3 et 10 pour cent). Elles ne sont toujours pas significatives.

Par l'examen des surfaces, il se dégage un dernier fait intéressant. Les surfaces des sacs duodénaux sont toujours plus réduites chez les rats surrénalectomisés traités que chez les témoins incisés traités (Tableau XVI).

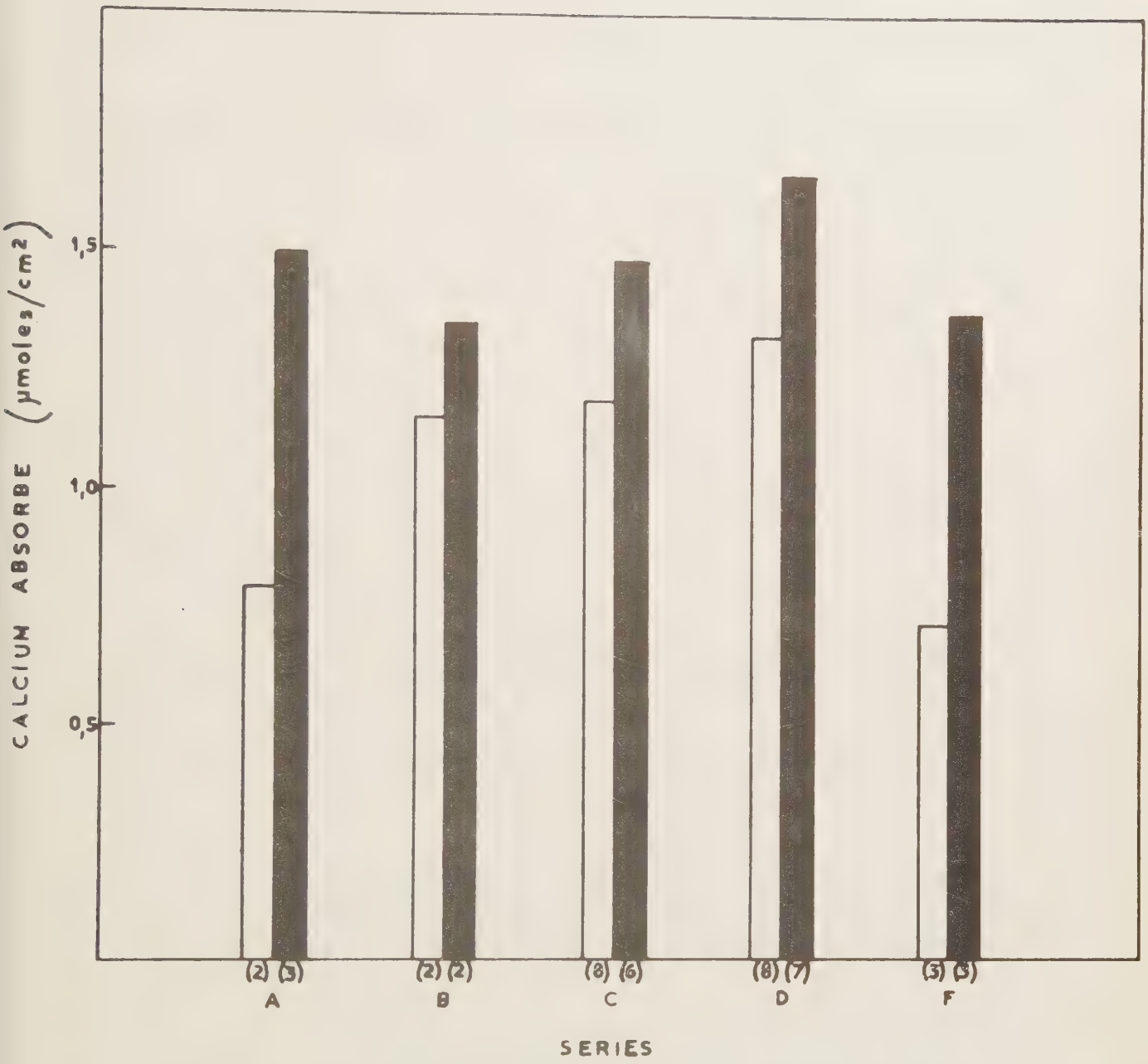


Figure 9 - Action de la vitamine D_3 (1.000 U.I. per os, 48 heures au préalable) sur l'absorption calcique duodénale de rats surrénalectomisés.
Représentation graphique des résultats obtenus avec cinq séries d'animaux.
L'absorption est exprimée en µmoles / cm^2 de surface de muqueuse intestinale

Surrénalectomisés carencés (groupes 21)

Surrénalectomisés traités (groupes 22)

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats par groupe.

TABLEAU XVI

Réduction de la surface duodénale par surrénalectomie
48 heures après administration de 1.000 U.I. de vitamine D_3 per os

Série	A	B	C	D	E
Témoins incisés traités	316 (6)	314 (4)	365 (4)	410 (3)	310 (3)
Surrénalectomisés traités	281 (3)	278 (2)	271 (6)	269 (7)	266 (3)
Réduction de surface (en pourcentage)	11	11,5	26	34	14

Chaque chiffre des lignes 2 et 3 représente la surface moyenne en mm^2 des sacs duodénaux d'un groupe de rats.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats par groupe.

Les réductions de circonférence obtenues pour les séries B, C, D et E sont respectivement de 23, 19 *, 16 et 8 pour cent . Seule la différence observée dans le cas de la série C est significative : elle est obtenue avec un nombre d'animaux plus important répartis plus uniformément dans les deux groupes.

Cette action de la surrénalectomie se traduit sur l'absorption du calcium (fig 10). La réduction d'absorption, ramenée à l'unité de surface, observée dans les séries A et B après surrénalectomie de rats non carencés et traités, devient négligeable. Dans les autres séries, c'est une augmentation d'absorption par unité de surface que l'on peut noter.

*

* *

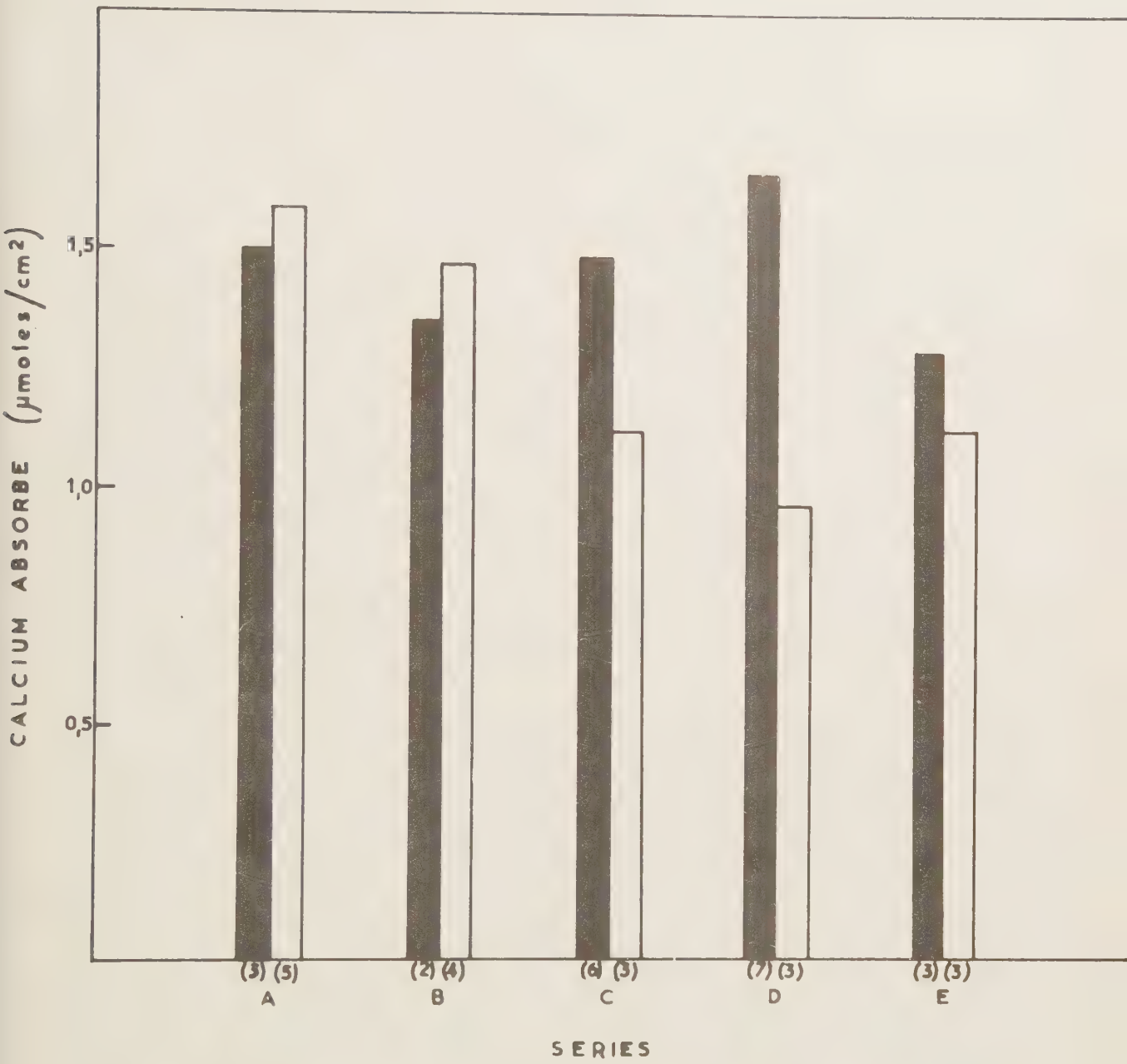


Figure 10 - Action de la surrénalectomie sur l'absorption calcique duodénale de rats traités par de la vitamine D_3 (1.000 U.I. per os, 48 heures au préalable). Représentation graphique des résultats obtenus avec cinq séries d'animaux. L'absorption est exprimée en µmoles / cm^2 de surface de muqueuse intestinale.

Surrénalectomisés traités (groupes 22)

Témoins traités (groupes 12)

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de rats par groupe.

DISCUSSION

1) La première remarque qui s'impose est l'importance de l'absorption chez les animaux témoins. Nous la trouvons toujours comprise entre 72 et 97 pour cent, même chez des rats carencés en vitamine D. Ces chiffres doivent être comparés à ceux obtenus par d'autres auteurs. Les seules comparaisons valables peuvent porter sur des animaux de même race, d'âge voisin, sur le même segment intestinal et dans des conditions identiques de concentration. Les conditions observées par OGASAWARA (94) se rapprochent assez des nôtres : avec des rats de 180 grammes et une solution calcique 25 mM dont il injectait 1 ml dans des sacs duodénaux de 15 cm de long, l'absorption atteignait 68 pour cent du calcium administré en une heure et 86 pour cent avec 400 U.I. de vitamine D_2. Il n'est donc pas étonnant qu'avec des rats plus jeunes et une solution plus concentrée le pourcentage absorbé soit supérieur. Il est aussi possible de comparer un certain nombre de chiffres obtenus par différents auteurs avec des solutions de concentrations différentes à condition d'exprimer le transfert en µmoles/cm d'intestin/heure, lorsque les données indiquées dans les publications sont suffisantes : les valeurs obtenues sont rassemblées dans le tableau XVII et la figure 11.

L'existence d'une certaine proportionnalité entre les deux facteurs ne semble pas douteuse. Le niveau élevé d'absorption observé doit être provoqué par une diffusion importante due à la concentration de la solution ; WASSERMAN en 1962 (141) considérait que la constance du pourcentage absorbé pour des concentrations allant de 5 à 125 mM indiquait une proportionnalité directe entre le taux absolu de calcium absorbé et la concentration, donc un processus de diffusion ou un processus physique similaire.

Le régime auquel les rats sont soumis dès le sevrage présente un rapport Ca/p équilibré : les besoins en calcium de nos animaux sont donc, sans doute, normaux au moment de l'étude de l'absorption. D'autre part, la concentration de la solution calcique que nous injectons dans les sacs est relativement élevée. Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que la vitamine D n'ait qu'une action réduite. D'ailleurs, en administrant per os des doses importantes de calcium (10 mg), HARRISON (49) fait des constatations voisines : l'absorption initiale du calcium est très rapide et pratiquement identique chez des rats dont le régime est privé de vitamine D et chez d'autres animaux dont le régime est supplémenté en cette vitamine. On peut aussi penser que nos rats sont incomplètement carencés en vitamine D. Cependant ils ont été maintenus de 25 à 40 jours à un régime d'où la vitamine D était exclue et même, pour plusieurs séries (D, E, F), à l'obscurité. Cette absorption submaximale du calcium ne constitue pas pour nous un obstacle, le problème n'étant pas de démontrer une fois de plus l'action de la vitamine D sur l'absorption intestinale du calcium chez le rat mais bien d'étudier l'influence de la surrénalectomie sur cette action.

TABLEAU XVII

Vitesse de transfert du calcium à travers la paroi intestinale
par cm de longueur en fonction de la concentration calcique de la solution

Auteur	Origine du sac	Concentration en mM	Transfert en µmoles/cm/h
VAUGHAN (138)	Iléon de rat	125	3,1
Résultats personnels	Duodénum de rat	33,5	1,3
OGASAWARA (94)	Duodénum de rat	25	1,2
WASSERMAN (141)	Duodénum de poussin	25	0,95
HARRISON (50)	Duodénum de rat	3	0,1
WASSERMAN (141)	Duodénum de poussin	1	0,05

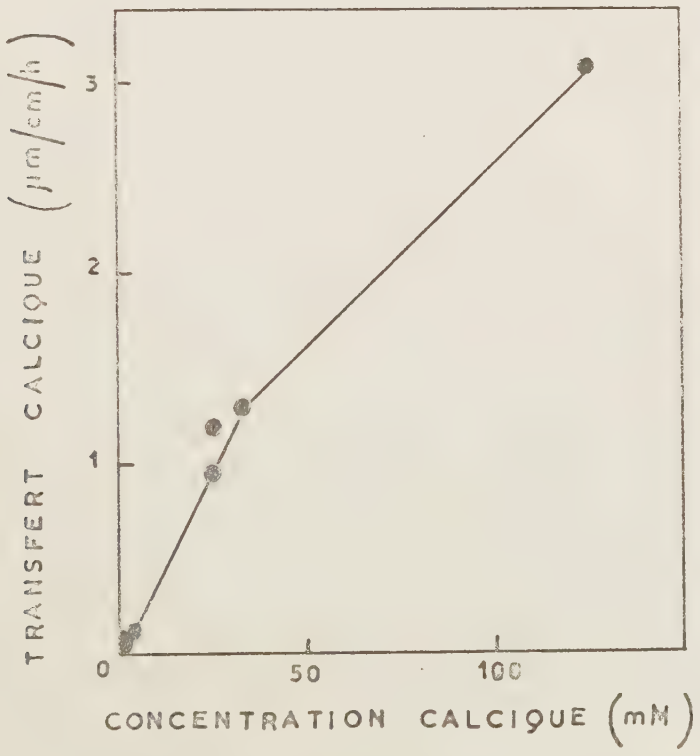


Figure 11 - Vitesse de transfert du calcium à travers la paroi intestinale par centimètre de longueur, en fonction de la concentration calcique de la solution.

2) Les conclusions auxquelles nous aboutissons avec des animaux surrénalectomisés impliquent une ablation totale des glandes et l'absence de surrénales accessoires chez nos rats. Nous avons donc tracé les courbes de croissance individuelles des animaux. Il est certain que si quelques-unes ont repris après un certain nombre de jours une pente parallèle à celle des témoins, les absorptions calciques des animaux correspondants ne s'écartent pas sensiblement de la moyenne de leur groupe. Une incertitude persiste cependant et nous pensons qu'une utilisation ultérieure de rats de souche SHERMAN ne présentant pas de surrénales accessoires pourrait apporter éventuellement une confirmation à nos résultats. SALLIS et HOLDSWORTH (116), en inhibant le fonctionnement du cortex surrénalien par l'o,p - DDD * pour montrer les rapports entre la vitamine D_3 et ces glandes endocrines, partaient d'une hypothèse difficilement vérifiable : l'action exclusivement surrénalienne de l'inhibiteur utilisé. Nous-même montrons ici, chez le rat, que la vitamine D_3 agit de façon nette et constante sur l'absorption duodénale du calcium en l'absence de capsules surrénales. C'est peut-être cette action qui permet le retour à la normale grâce à la vitamine D de la calcémie du rat surrénalectomisé rachitique qu'avait observé HANSSLER (47).

L'administration de glucocorticoïdes diminue l'absorption du calcium (16). Mais le mécanisme de cette action n'est pas élucidé. Elle peut être directe, secondaire à l'action osseuse des glucocorticoïdes ou bien aussi la conséquence d'une atrophie du cortex surrénalien à la suite d'une administration prolongée. Il semble donc à première vue, que la surrénalectomie devrait s'accompagner d'un accroissement d'absorption par rapport au niveau des témoins incisés et c'est bien ce que nous observons, du moins par unité de surface, sur des animaux surrénalectomisés, normaux par ailleurs, c'est-à-dire auxquels nous administrons de la vitamine D (séries C, D et E). Mais c'est le phénomène inverse qui se produit avec des rats carencés.

3) Au départ, les animaux qui sont carencés, c'est-à-dire les quatres groupes des séries C, D et E présentent un certain taux d'absorption (fig 12). Ce taux se maintient chez les témoins carencés incisés puisque, comme nous l'avons vérifié, il n'existe pas de différence sensible entre témoins normaux et témoins incisés. Sa valeur nous est fournie par la mesure de l'absorption du groupe 11. Elle augmente légèrement dans nos conditions expérimentales sous l'action de la dose de vitamine D_3 administrée quarante huit heures avant la mesure : c'est ce que nous constatons par comparaison des valeurs obtenues pour les groupes 11 et 12. Simultanément, nous constatons que l'absorption est bien plus faible chez les rats surrénalectomisés carencés : la surrénalectomie a donc diminué l'absorption. De plus, comme chez les surrénalectomisés traités elle est égale ou parfois supérieure à celle des témoins, c'est que la présence de vitamine D_3 la fait remonter. Parallèlement à cette augmentation s'observe une réduction de la surface duodénale en dessous des valeurs moyennes observées tant chez les témoins incisés traités que chez les surrénalectomisés carencés. La morphologie du duodénum semble donc pouvoir dépendre d'une interaction entre capsules surrénales et vitamine D_3 .

---

* 1 - (2 - chlorophényl) - 1 - (4 - chlorophényl) 2 - 2 dichloroéthane.

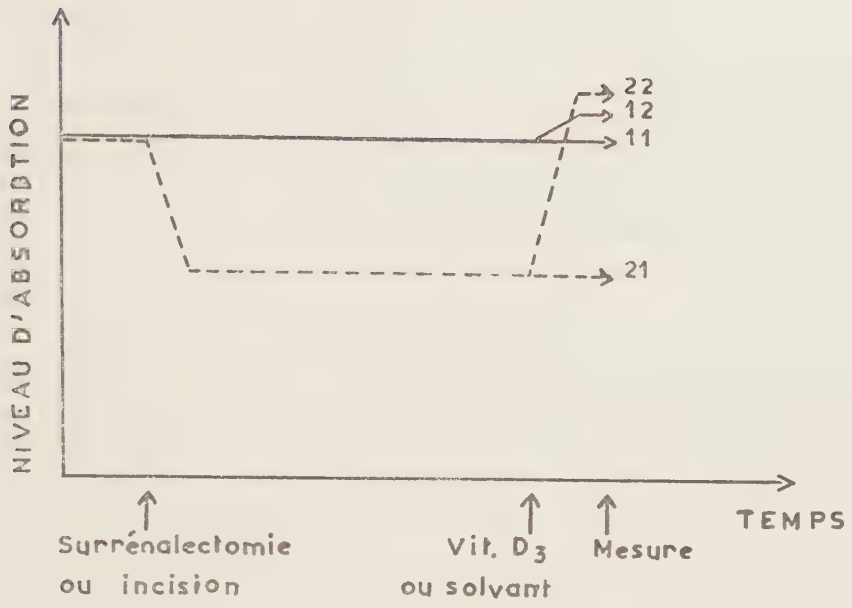


Figure 12 - Schéma explicatif des actions respectives de la surrénalectomie et de la vitamine D_3 sur l'absorption calcique duodénale du rat.

11 rats témoins carencés — 12 rats témoins carencés traités
21 rats surrénalectomisés carencés — 22 rats surrénalectomisés carencés traités

La facilité d'absorption observée en présence de surrénales doit correspondre à une action directe, non encore signalée, de ces glandes sur l'absorption. Dans un même ordre d'idées, il faut noter l'hypertrophie qu'elles présentent chez le jeune rat au cours du rachitisme expérimental (55).

Le fait que des animaux surrénalectomisés traités puissent absorber plus que des témoins traités (comparaison des groupes 12 et 22, série D, Figure 7 et Figure 10), bien que la différence ne soit pas significative, est à rapprocher de l'accroissement de transport actif que semble provoquer la surrénalectomie pour KIMBERG ($P < 0,02$, 59). Favorisant la néoglycogénèse à partir des acides gras et des acides aminés, les glucocorticoïdes ont une action "antianabolique" sur les protéines et en particulier sur celles du tissu osseux. Cette action se traduit, au niveau de l'os, par une réduction de l'activité des ostéoblastes et par une diminution de la vitesse de formation de l'os. On peut penser que la chute du taux des corticoïdes qui suit la surrénalectomie doit provoquer un regain d'activité des ostéoblastes ; si, à ce moment, on fournit à l'animal de la vitamine D, ses besoins en calcium étant élevés, l'absorption intestinale est importante.

On peut aussi penser que l'absence de corticoïdes, eux-mêmes peut-être inhibiteurs directs de l'absorption à doses pharmacodynamiques, permet à la vitamine D d'accroître l'absorption au-dessus de la valeur réalisée chez les témoins.

Dans le cas des séries A et B, les rats traités ne sont pas carencés au préalable en cette vitamine. Leur besoins en calcium au moment de la surrénalectomie sont donc inférieurs à ceux d'animaux carencés. Ceci pourrait expliquer l'action plus réduite de la vitamine D chez ces animaux surrénalectomisés par rapport à leurs homologues des séries C, D et E. Du moins peut-on penser que la vitamine D stockée avant l'intervention joue un rôle.

4) Puisque la vitamine D_3 facilite l'absorption calcique duodénale chez des rats privés de leurs surrénales, les concentrations importantes atteintes par cette vitamine dans ces glandes endocrines ne correspondent pas à une transformation de la vitamine D_3, inactive par elle-même, en un corps favorisant l'absorption calcique. Mais la vitamine D possède d'autres actions, principalement sur l'os. Il est donc très possible que l'éventuel métabolite formé dans les capsules surrénales agisse sur cet autre tissu. Cependant, à ce niveau, si l'action de la vitamine D est nette, son mécanisme est encore plus loin d'être élucidé que celui de son action sur l'absorption intestinale. La démonstration du rôle des surrénales sera donc plus délicate dans ce cas. De toute façon, une telle modalité d'action s'accorderait parfaitement avec l'observation de HANSSLER ; l'élévation de la calcémie du rat surrénalectomisé par la vitamine D ne s'accompagne pas, en effet, de la guérison du rachitisme.

*
* *

CONCLUSION

L'étude simultanée de deux facteurs, la vitamine D_3 et les glandes surrénales, nous permet de préciser un peu plus leurs parts respectives dans les modalités de l'absorption duodénale du calcium chez le rat *in vivo* lorsque cet alcalino-terreux est introduit sous forme d'une solution de chlorure 33,5 mM dans une anse intestinale.

Un simulacre d'opération, une dizaine de jours avant la détermination modifie peu l'absorption chez des rats à régime équilibré et supplémenté en vitamine D. Cette absorption est importante chez les témoins incisés même si leur régime est dépourvu de vitamine D.

Chez les rats carencés en vitamine D, la surrénalectomie réduit l'absorption duodénale du calcium.

Administrée *per os* quarante huit heures au préalable, la vitamine D_3 facilite l'absorption calcique à partir des anses intestinales chez les rats surrénalectomisés. Elle semble, de plus, provoquer chez ces animaux une légère involution du duodénum.

Ces constatations nous autorisent à conclure à l'inutilité d'une transformation surrénalienne de la vitamine D_3 en rapport avec son action intestinale et à l'existence d'une action propre des surrénales de sens opposé à celle provoquée par de fortes doses de glucocorticoïdes. Il semble donc que le facteur endogène de l'absorption calcique que sont les capsules surrénales et le facteur exogène que constitue la vitamine D agissent tous deux au niveau duodénal et de façon au moins partiellement indépendante.

*

* *

3ème PARTIE

ACTION DE LA VITAMINE D SUR LE SYSTEME SUCCINODESHYDROGENASIQUE DE L'INTESTIN ET DE DIVERS TISSUS DU RAT, DU POULET ET DU COBAYE

ACTION DE LA VITAMINE D SUR LE SYSTEME SUCCINODESHYDROGENASIQUE DE L'INTESTIN ET DE DIVERS TISSUS DU RAT, DU POULET ET DU COBAYE

POSITION DU PROBLEME – RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

Ce sont ZUCKER et MATZNER (152) qui ont montré les premiers que l'administration de vitamine D est suivie d'un abaissement du pH intestinal. Cette acidification peut provenir de la muqueuse intestinale, d'une digestion modifiée du chyme ou indirectement de la flore intestinale ; on peut penser que la vitamine D, provoquant l'absorption du calcium, laisse un résidu intestinal plus acide ou qu'elle accélère des processus d'acidification enzymatique, par exemple :

– action sur les phosphatases : l'activation obtenue par ZETTERSTRÖM et LJUNGGREN (151) avec de la vitamine D_2 rendue soluble sous forme phosphorylée est encore sujette à discussion.

– action sur la glycolyse ou la respiration, qui fait l'objet de l'étude ci-dessous.

Des observations ont été déjà réalisées à ce propos.

Sans qu'il soit question de la vitamine D, VITALE et coll. (140) montrent sur la muqueuse gastrique que l'histamine provoque simultanément une augmentation de l'acidité titrable et de l'activité de la succinodéshydrogénase et de la cytochrome oxydase. LANDELIUS et LJUNGVIST (69) trouvent une production d'énergie augmentée chez les rats recevant de la vitamine D par rapport aux témoins demeurés rachitiques. ZETTERSTRÖM (150) observe une activation de l'oxydation du glutamate par les mitochondries de rein en présence de vitamine D_2 phosphorylée ($5.\ 10^{-2}$ µmoles). Pour ZAR et IRVING (149), la même vitamine D_2 phosphorylée augmente le $Q\ O_2$ de la muqueuse orale du rat rachitique en présence de succinate ou de malate. NASON et LEHMAN (89) recherchant des cofacteurs lipidiques des systèmes transporteurs d'électrons n'observent qu'une très faible

action de la vitamine D_2 contrairement au tocophérol (0,3 µmoles) sur la D P N H cytochrome C réductase extraite par l'isooctane. FESTENSTEIN (33), par contre, constate une inhibition de la glycolyse anaérobie de coupes de foies de rats par la vitamine D_2. DE LUCA (25) a examiné le cycle de KREBS dans ses rapports avec la vitamine sous un autre angle (rôle des citrates) ; cet auteur avec des mitochondries de rein, observe une action inhibitrice de la vitamine, in vitro comme in vivo, sur les systèmes à T.P.N. (substrat = citrate ou isocitrate) ou plus exactement la vitamine, selon lui, réduirait la pénétration des citrates dans les mitochondries (notons que NEUMAN et DOWSE (91) signalent l'interaction des spectres du D.P.N. et du T.P.N. avec celui de la vitamine D par incubation in vitro, le spectre du mélange présentant des densités optiques inférieures aux sommes des densités optiques des constituants. Enfin, BRUCHMANN (7) observe l'inhibition par la vitamine, in vitro, de l'aconitase de coeur de porc (16 pour cent à une concentration $2.\ 10^{-1}$ mM) et, plus efficacement, par l'AT 10.

L'importance de la succinodéshydrogénase, découverte par THUNBERG en 1909, dans l'oxydation terminale des hydrates de carbone, graisses et acides aminés n'a été clairement reconnue qu'à la suite des études sur le cycle tricarboxylique. Dans les tissus animaux, l'oxydation du succinate en fumarate se relie ultérieurement à 0_2 par l'intermédiaire du cytochrome C et de la cytochrome oxydase. Cette chaîne d'enzymes, même dans des préparations colloïdales privées de cellules, agit comme un système multienzymatique dont l'activité dépend non seulement de l'intégrité de chaque constituant mais aussi de l'intégrité de la liaison entre ses composants. La chaîne complète d'enzymes a été nommée " succinoxydase ", le terme " déshydrogénase succinique " étant retenu pour la déshydrogénase primaire qui accepte les électrons en provenance du succinate.

Le " complexe succinodéshydrogénasique " ou S.D.C. est formé par la chaîne d'enzymes qui transporte hydrogène et électrons du succinate au cytochrome C ou selon certains seulement au cytochrome e, ce en quoi il diffèrerait du complexe SC de STOTZ (32, 90, 147).

C'est une modification éventuelle de l'activité de ce complexe (S.D.C.) sous l'action de la vitamine D que nous avons cherché à déterminer. En effet, il existe normalement très peu de succinodéshydrogénase dans la muqueuse de l'intestin grêle du rat, ou, plus exactement, elle s'y trouve sous une forme inactive. On peut donc supposer que la vitamine D pourrait activer cet enzyme, d'où libération possible d'ions H^+ qui, après passage dans la lumière intestinale, provoqueraient l'acidification du milieu.

Un bon nombre de méthodes ont été proposées pour l'estimation de cette déshydrogénase. Selon SINGER et KEARNEY (121) il est impossible de délimiter les zones d'applicabilité de ces méthodes qui, toutes, ont conduit à des indications valables sur l'activité de l'enzyme, dans des préparations plus ou moins brutes ; il faut les appliquer avec beaucoup de prudence à la mesure de la teneur enzymatique des cellules et même à la mesure de l'effet de traitements variés sur la déshydrogénase car les enzymes additionnels (à côté de la déshydrogénase elle-même) jouent, selon toute probabilité, un rôle dans ces méthodes.

Deux d'entre elles ont été utilisées sur des homogénats de tissus : une méthode colorimétrique (KUN et ABOOD, chlorure de triphényltétrazolium), une méthode manométrique (SCHNEIDER et POTTER) finalement seule retenue ici, après les essais préliminaires que nous rapportons.

METHODE DE KUN et ABOOD (68)

Dans cette méthode, on utilise le chlorure de triphényltétrazolium comme indicateur de l'activité succinodéshydrogénasique des homogénats tissulaires : à pH 7,4 , en présence de succinate le sel précédent est réduit en un formozan rouge, insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, ce qui permet un dosage colorimétrique.

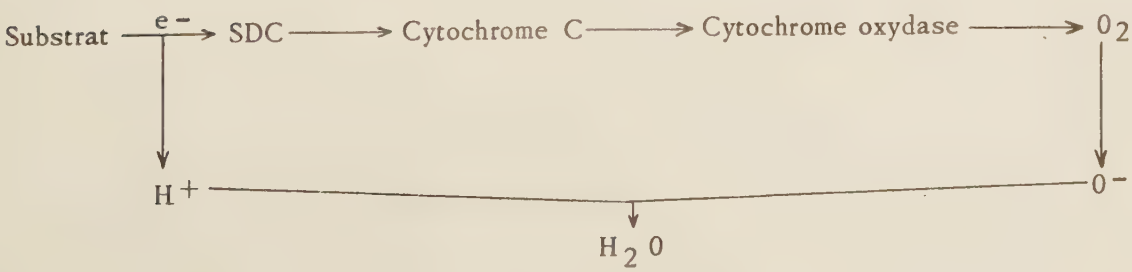
Par cette technique, des homogénats de muqueuse intestinale de rat normal ou bien carencé ayant ou non reçu de la vitamine D 3 (50 μg/ 200g) per os, 1, 3 ou 6 heures au préalable, ne montrent aucune activité succinodéshydrogénasique.

L'activité est identique pour un homogénat de coeur de rat carencé, ayant reçu de la vitamine D 3 (50 μg/ 200g) per os, 3 heures au préalable, en présence ou non de 50 μg de vitamine.

Les essais par cette méthode n'ont pas été poursuivis car on a noté une adsorption irrégulière du colorant sur le précipité rendant les dosages problèmatiques.

METHODE DE SCHNEIDER et POTTER (120)

Le schéma de la réaction peut se représenter de la façon suivante :



Par suite de la prépondérance de la cytochrome oxydase sur la succinodéshydrogénase dans les tissus, le facteur limitant est constitué par ce dernier enzyme.

A/ TECHNIQUE

1) Appareillage

- Appareil de WARBURG *, cuve parallélipipèdique, t° : 37,1° C, étalonnage des manomètres et fioles au mercure. Liquide manométrique de BRODIE non coloré.
  Lectures effectuées en poursuivant l'agitation.

- Homogénéiseur de POTTER **, à cylindre de verre et piston de verre ou de téflon.

2) Réactifs

La fiole de WARBURG renferme :

Succinate de Na	0,5 M		0,05 M
Cytochrome C (coeur de boeuf)	1.10^{-4} M	concent. finales	$1,34.\ 10^{-5}$ M
$Ca\ Cl_2$	4.10^{-3} M		$4\ .\ 10^{-4}$ M
$Al\ Cl_3$	4.10^{-3} M		$4\ .\ 10^{-4}$ M
Tampon phosphate pH 7,4	0,1 M		0,033 M

Homogénat de tissu à 5 ou 10 pour cent dans l'eau (0,5 à 5 mg de tissu sec)

eau q.s.p. 3 ml

De plus, dans la cuve centrale 0,2 ml de N_aOH 2N avec 3 cm^2 de papier filtre plissé.

---

* JOUAN (Paris)

** BRAUN, dépositaire : ROUCAIRE (Paris)

Les ions Ca^{++} interviendraient en temps qu'agent découplant la phosphorylation de l'oxydation (inhibition de la phosphorylation oxydative) ce qui permettrait au système d'oxyder le succinate en fumarate à un rythme maximum, la respiration n'étant pas arrêtée lorsque la phosphorylation cesse après consommation de tout l'A.D.P. des tissus (97). De toute façon le jeûne des animaux doit intervenir comme agent de découplage (98). Les ions Al^{+++} accélèreraient la décarboxylation de l'oxalacétate formé en présence de D.P.N. (97), action actuellement discutée dans son existence même (56). Pour KEILIN et HARTREE (58) les sels de calcium ou d'aluminium entraîneraient la formation de précipités gélatineux de phosphate de calcium ou d'aluminium sur lesquels les catalyseurs d'oxydoréduction pourraient se disperser de manière plus stable.

3) Nature des tissus étudiés

Le rat Wistar, le cobaye et le poulet Leghorn sont les animaux utilisés.

Poulet

Les poussins Leghorn, mâles, de 2 jours, reçoivent pendant 16 à 30 jours, un régime totalement dépourvu de vitamine D, équilibré mais pauvre en calcium et en phosphore (0,59 pour cent de calcium, 0,45 pour cent de phosphore) (2) à base de caséine, semoule jaune de maïs, issues de blé, levure, sels minéraux. Au bout de ce temps, les animaux présentent toutes les caractéristiques du rachitisme. Les cages sont chauffées et éclairées par des lampes à filament de carbone.

Tissu étudié : muqueuse de l'intestin (35 premiers centimètres, soit environ les deux tiers de sa longueur).

Cobaye

Tissu étudié : muqueuse de l'intestin grêle du mâle jeune adulte à régime mixte (concentré - fermier).

Rat

de souche Wistar

1) rats mâles adultes à régime concentré (ratigène)

Tissus : muqueuse d'intestin grêle et foie.

2) rats mâles adultes au régime de HAAVALDSEN-NICOLAYSEN à base de caséine, albumine d'oeuf, levure, huile d'arachide, farine de blé, sels minéraux, vitamine B 12 (46), depuis au minimum 40 jours et au maximum 135 jours. Eclairage électrique de l'animalerie, 10 heures par jour environ, 6 jours par semaine.

Tissus : muqueuse d'intestin grêle, foie coeur, rein, cerveau.

3) jeunes rats rachitiques (7 semaines, 25 g) au régime rachitigène hypercalcique de STEENBOCK et BLACK (125) pendant 4 semaines.

Tissus : muqueuse d'intestin grêle et rein.

4) Nature des vitamines utilisées

Les essais ont été effectués avec des vitamines D_3 et D_2 de diverses origines *.

5) Essais préliminaires pour le choix d'un adjuvant de dispersion

Ces vitamines étant liposolubles sont utilisées sous forme de suspension. Différents adjuvants ont été essayés avec des homogénats de coeur de rat (fig. 13 et 14).

Tween 20** : l'addition de 50 µl par fiole (soit environ 1,70 pour cent) dès le départ comme en cours de réaction empêche la déshydrogénation du substrat en présence d'un homogénat de coeur : -87 pour cent dans les deux cas (moyenne des 30 premières minutes).

Propylène glycol : l'addition d'une même quantité de solvant dès le départ a une action identique : -29 pour cent (moyenne des 30 premières minutes), -45 pour cent (moyenne des 60 premières minutes).

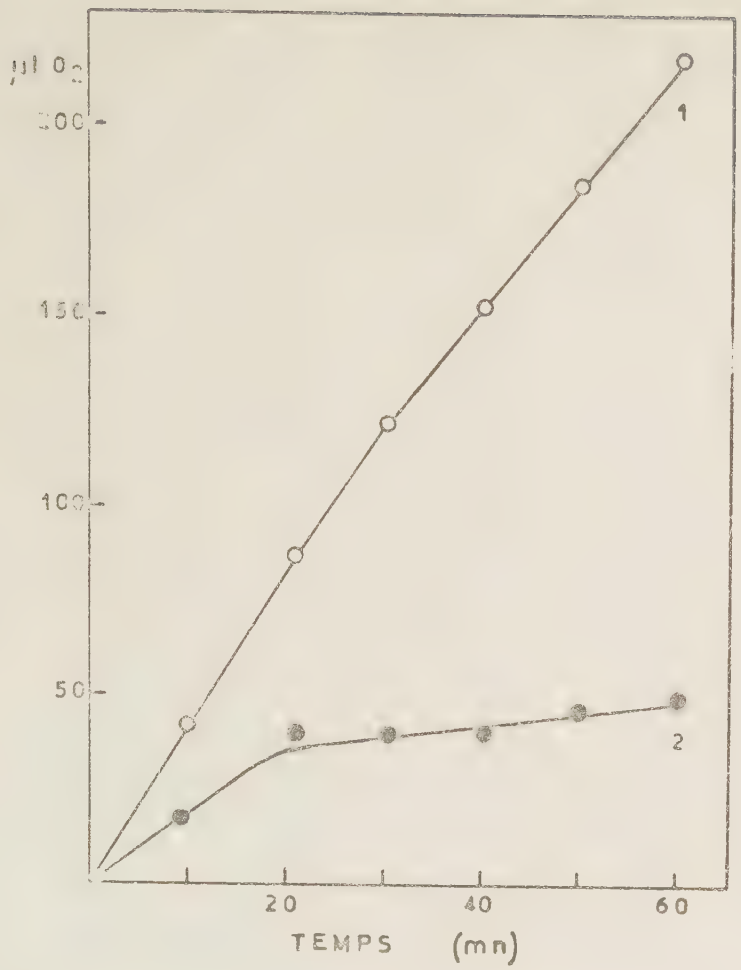
Ethanol : dans les mêmes conditions, l'inhibition est nettement moindre : -14 pour cent (moyenne des 60 premières minutes).

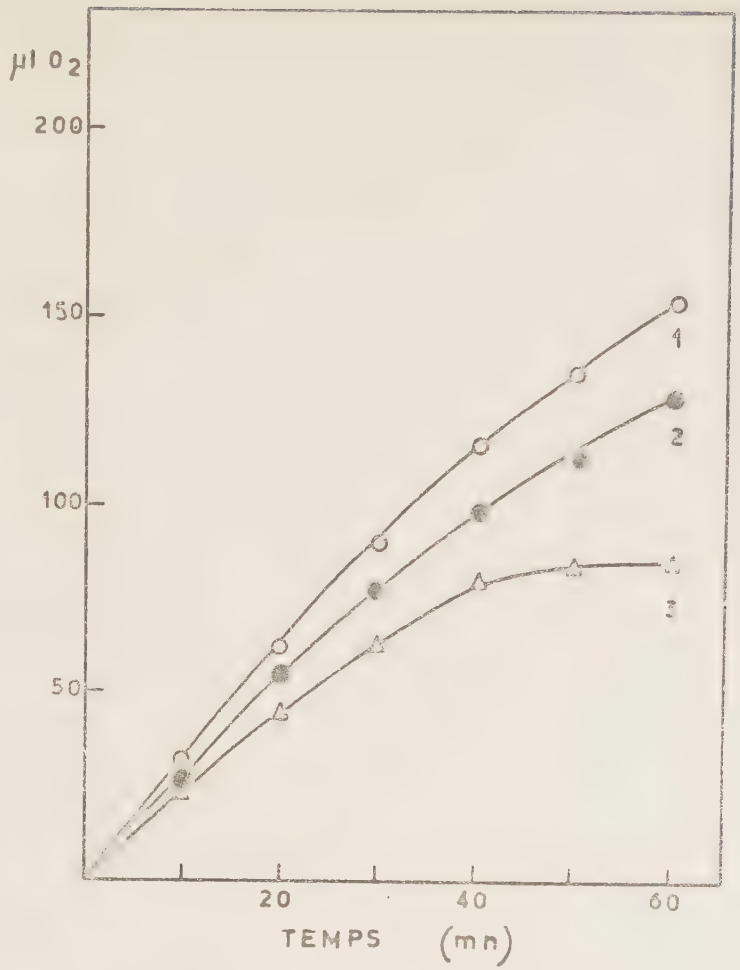
---

* Essais sur le rat : Vitamine D_3 MERCK (lots 1231.191 et 1211.180bis, contrôlés l'un par rapport à l'autre avec un homogénat de coeur)
Vitamine D_2 U.C.L.A.F. (lot W 4796)

Essais sur le poulet : Vitamine D_3 PHILIPS-DUPHAR (lot MR 434)

** Essai effectué sur un rat ayant reçu de la vitamine D_3 per os, 3 h avant l'essai.





Figures 13 et 14 - Action de différents solvants sur l'activité succinodéshydrogénasique d'homogénats de tissu cardiaque de rat. Courbes cumulatives de la consommation d'oxygène.

Figure 13

Courbe 1 = homogénat témoin
Courbe 2 = homogénat témoin + tween 20 (50 µl par fiole)

Figure 14

Courbe 1 = homogénat témoin
Courbe 2 = homogénat témoin + éthanol (50 µl par fiole)
Courbe 3 = homogénat témoin + propylène glycol (50 µl par fiole)

Avec un homogénat de foie de rat : -40 pour cent (30 premières minutes), - 30 pour cent (60 premières minutes).

Si nous groupons les résultats obtenus au cours de deux essais, avec des homogénats de foie, nous observons l'indice d'une proportionnalité entre la quantité d'éthanol par mg de tissu sec et le Q 0_2 (Tableau XVIII)

TABLEAU XVIII

Action de l'éthanol sur l'activité succinodéshydrogénasique d'un homogénat de foie

N° de l'essai	Ethanol/mg tissu sec (en ml)	Q 0_2
202	0,00	78,5
"	0,016	55,0
199	0,040	38,5

Remarquons qu'en 1955, FESTENSTEIN (33) signalait les actions inhibitrices du Tween 80 (0,01 pour cent) et du propylène glycol (1 pour cent) sur la glycolyse anaérobie de tranches de foie de rat.

C'est finalement l'éthanol que nous avons retenu. La vitamine D est dissoute dans l'éthanol et la solution est alors étendue d'eau distillée. On introduit 0,1 ou 0,2 ml de cette suspension dans chaque fiole de WARBURG, soit 50 ou 100 µl d'éthanol, une quantité identique de solvant étant, bien entendu, introduite dans les fioles témoins.

Dans le cas des homogénats d'intestin de poulet, l'éthanol s'est révélé inutilisable car il entraîne une inhibition importante de la déshydrogénation du substrat (fig 15). Disposant d'un évaporateur rotatif, nous avons pu utiliser une dispersion alcoolique dont l'adjuvant est éliminé sous vide à 45° C. La suspension aqueuse ainsi obtenue s'est révélée très stable par suite de la finesse des particules. Extraite par l'éther éthylique 8 heures après préparation, la vitamine D_3 présente un spectre ultraviolet correct ; par contre, après 48 heures à + 4° C, elle est en grande partie transformée. Le solvant ajouté dans les fioles témoins est traité dans des conditions rigoureusement identiques pour le cas où des traces d'éthanol ne seraient pas éliminées.

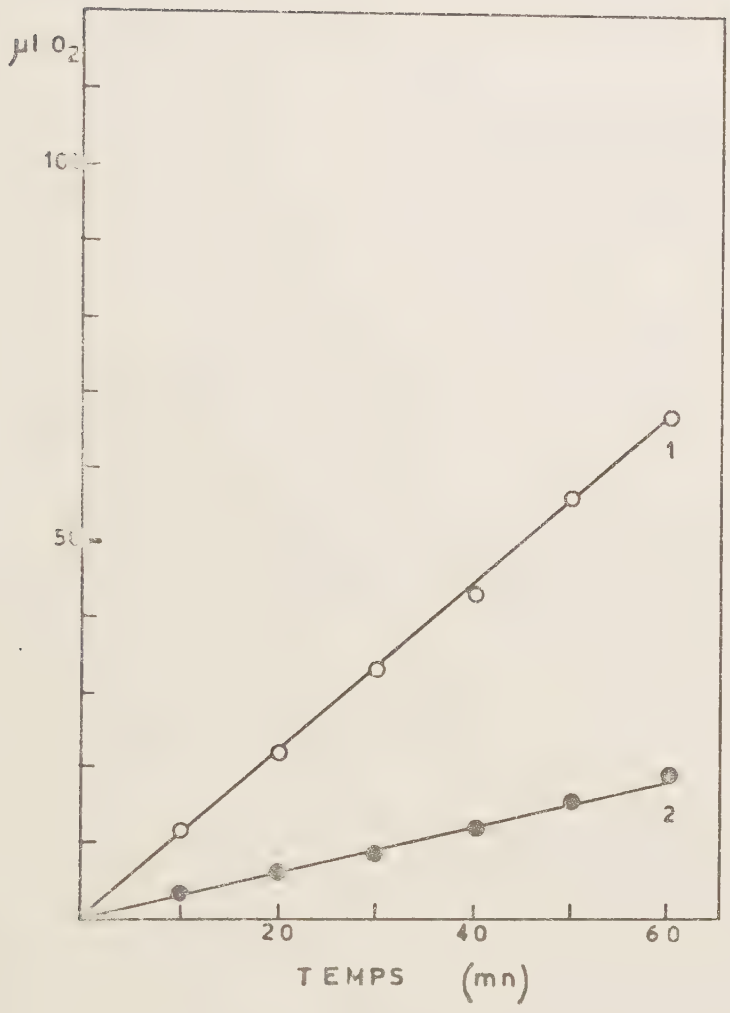


Figure 15 - Action de l'éthanol sur l'activité succinodéshydrogénasique d'un homogénat d'intestin de poulet. Courbes cumulatives de la consommation d'oxygène.

Courbe 1 : homogénat témoin

Courbe 2 : homogénat témoin + éthanol (50 µl par fiole)

6) Protocole opératoire

Les tissus sont prélevés sur des animaux à jeun, tués par saignée. Après broyage ou dilacération rapide aux ciseaux, ils sont pesés en capsule de porcelaine, entraînés par de l'eau distillée à 0° C dans l'homogénéiseur de POTTER, lui-même maintenu dans un bain d'eau glacée. On dilue à 5 à 10 pour cent (en tissu frais) avec de l'eau distillée à 0° C et homogénéise pendant 90 secondes.

Dans le cas de l'intestin, l'organe est placé dans une capsule de verre maintenue à 0° C ; il est lavé extérieurement à l'eau distillée froide, ouvert longitudinalement, lavé à nouveau ; la muqueuse est séparée par raclage en opérant dans un récipient approprié maintenu à basse température.

La consommation d'oxygène est suivie pendant un minimum de 1 heure. On détermine le Q 0_2 : μl d'oxygène fixés par milligramme de tissu sec et par heure. Le poids de tissu sec est obtenu par évaporation à l'étuve à 100° C de 3 ml d'homogénat et pesée à poids constant.

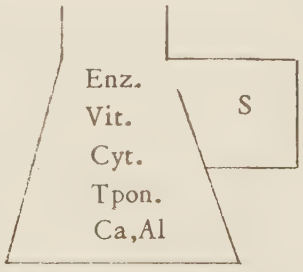
a) Expériences in vitro

En 1959, THOMPSON (133) étudiant l'inhibition compétitive de la succinoxydase par l'acide acétylène dicarboxylique (ADC) notait l'importance de l'ordre d'addition du substrat et de l'inhibiteur : si après 20 minutes on ajoute l'inhibiteur au mélange substrat-enzyme, le Q 0_2 passe en 5 heures de 100 à 20 pour cent (diminution de 35 pour cent en 1 heure) , par contre, si après 20 minutes de contact entre enzyme et inhibiteur, on ajoute le substrat, le Q 0_2 , nul au départ, atteint en 5 heures 20 pour cent du témoin (7 pour cent après 1 heure, soit une inhibition de 93 pour cent).

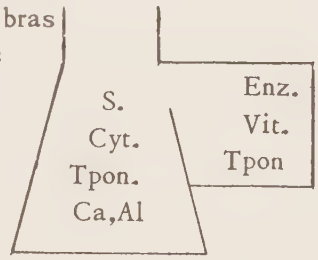
Aussi nous avons modifié les conditions du dosage pour tenter d'observer des variations éventuelles dans les résultats obtenus.

- 1er groupe d'expériences : Tous les réactifs sont introduits dans le compartiment principal de la fiole. Temps d'équilibre avant le début des lectures : 20 minutes.

- 2ème groupe d'expériences : Tous les réactifs, à l'exception du substrat S, sont introduits dans le compartiment principal de la fiole.
  Après 5 minutes le substrat l'est dans le bras latéral.
  Mélange après 15 minutes d'équilibre (temps de contact entre enzyme et vitamine avant le départ de la réaction principale).

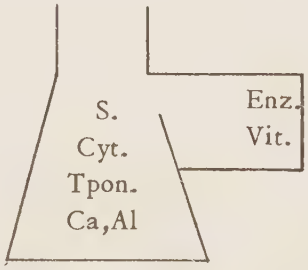


- 3ème groupe d'expériences : Tous les réactifs à l'exception de l'enzyme et de la vitamine sont introduits dans le compartiment principal de la fiole. Après 15 minutes l'enzyme et la vitamine le sont dans le bras latéral, en présence de tampon. Mélange après 10 minutes d'équilibre (temps de contact entre enzyme et vitamine).



Par rapport à la technique précédente, enzyme et vitamine sont en contact, toujours à pH 7,4, mais en l'absence de cytochrome et d'ions Ca^{++} et pendant un temps plus court. Le but de cette modification est de limiter au maximum la destruction de la vitamine.

- 4ème groupe d'expériences : Identiques aux précédentes mais enzyme et vitamine sont introduits seuls dans le bras latéral (pH 6,1).



Pour les essais réalisés sur le poulet, les 15 minutes d'équilibre de température observées pour les réactifs introduits dans le compartiment principal ont été supprimées : la rapidité de l'équilibre les rendait en effet inutiles.

b) Expériences semi-in vitro

Ce terme désigne le type d'essai où la substance est administrée à l'animal vivant qui, après un temps convenable, est sacrifié, les propriétés de la préparation tissulaire étant alors comparées à celles d'une préparation provenant d'un animal témoin.

On donne per os aux poulets, 19 heures au préalable, 25 μg (1.000 U.I.) de vitamine D_3 en solution huileuse ou le solvant seul, aux rats, 3 heures avant, 60 μg (2.400 U.I.) en suspension hydro-alcoolique ou le solvant seul.

B/ PROGRAMME D'ANALYSE STATISTIQUE

Lorsque les données obtenues sont suffisamment nombreuses, elles sont interprétées statistiquement.

Le plan expérimental est du type " Avant-Après " ; un même homogénat est l'objet de deux mesures : détermination du Q 0_2 avec et sans addition de vitamine D.

La variation naturelle entre homogénats est importante ; chaque homogénat constitue donc un bloc et est soumis à deux traitements.

Les calculs de l'analyse de variance suivent la ligne générale déjà connue. Les seules différences sont l'adjonction d'une catégorie supplémentaire pour les blocs et une légère modification dans le calcul de l'erreur. Nous avons reproduit dans le tableau XIX un résumé des calculs auxquels les essais sur homogénats de coeur ont donné lieu.

TABLEAU XIX

Analyse de variance de l'action de la vitamine D in vitro sur la succinodéshydrogénase du tissu cardiaque du rat

	$Q\ O_2$					Totaux
homogénat + solvant	163	171	87	148	228	797
" + vit. D	96	123	54	119	181	573
Totaux	259	294	141	267	409	1.370

$$C = \frac{(1370)^2}{10} = 187.690$$

Variation totale $SX^2 = 163^2 + 171^2 + \ldots\ldots = 211.450$

$S.C. = 211.450 - 187.690 = 23.760$

$D.L. = 10 - 1 = 9$

Traitements $S.C. = \frac{797^2 + 573^2}{5} - 187.690 = 5.017$

$D.L. = 2 - 1 = 1$

Blocs $S.C. = \frac{259^2 + 294^2 + \ldots\ldots}{2} - 187.690 = 18.294$

$D.L. = 5 - 1 = 4$

Erreur S.C. = 23.760 - (5.017 + 18.294) = 449
D.L. = 9 - (1 + 4) = 4

Source de variation	S.C.	D.L.	C.M.	F
Traitements	5.017	1	5.017	44,79** ($F_{0,01}$ = 21,20)
Blocs	18.294	4	4.573	40,83** ($F_{0,01}$ = 15,98)
Erreur	449	4	112	
Total	23.760	9		

N.B. Les Q 0_2 indiqués sont le résultat d'une ou plusieurs déterminations dont on prend alors la valeur moyenne.

C/ RESULTATS EXPERIMENTAUX

- Expériences du 1er groupe

- Avec un homogénat de foie de rat adulte nourri au ratigène, nous obtenons un Q 0_2 = 65
- Avec un homogénat de muqueuse intestinale du même animal, Q 0_2 = 0
- Sur des rats adultes carencés : même absence d'activité de l'intestin.

Nous observons une inhibition de l'activité succinodéshydrogénasique du tissu cardiaque par l'addition d'un homogénat de muqueuse intestinale du même animal. (Cette action a été mise en évidence la même année par NAKAMURA et coll. (88)). L'addition de 50 μg de vitamine D_3 se traduit par une légère diminution du Q 0_2 du tissu cardiaque (-9 pour cent).

Comme par cette technique la présence de cytochrome oxydase est indispensable, on pourrait supposer que l'absence d'activité est due à un manque de cytochrome-oxydase, mais, dans ce cas, l'addition au tissu cardiaque de muqueuse intestinale ne se traduirait pas par une disparition presque totale de l'activité du premier. D'autre part, par

histochimie, on a pu montrer l'existence de succinodéshydrogénase (88) dans la muqueuse intestinale. On a donc sans doute affaire à une inhibition : NAKAMURA a isolé dans cette muqueuse des acides gras libres responsables de cette action.

– Expériences du 2ème groupe

Avec des homogénats de coeur, rein et cerveau de rats adultes carencés, le $Q\,0_2$ n'est pas sensiblement modifié par la vitamine D_3 (Tableau XX)

TABLEAU XX

Action de la vitamine D_3 sur l'activité succinodéshydrogénasique d'homogénats tissulaires de rats adultes carencés

Les résultats sont exprimés en pourcentages des $Q\,0_2$ des homogénats témoins

Homogénats	Vitamine D_3		$Q\,0_2$
	µmoles	µmoles/mg tissu sec	pourcentage de variation
Témoins	–	–	100
Coeur	0,12	0,14	90
Rein	0,25	0,11	100
Cerveau	0,25	0,14	100

– Expériences du 3ème groupe

Avec un homogénat de muqueuse intestinale de cobaye, le $Q\,0_2$ n'est pas sensiblement modifié par la vitamine D_3 . De même avec des homogénats de coeur, de rein, de cerveau et de foie de rats carencés. De même par la vitamine D_2 avec des homogénats de rein de rats carencés. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXI

TABLEAU XXI

Action des vitamines D_2 et D_3 sur l'activité succinodéshydrogénasique d'homogénats tissulaires de cobaye et de rats adultes carencés

Les résultats sont exprimés en pourcentages des $Q\,0_2$ des homogénats témoins

Homogénats	Vitamine D_3		Vitamine D_2		$Q\,0_2$
	µmoles	µmoles/mg sec	µmoles	µmoles/mg sec	pourcentage de variation
Témoins	–	–	–	–	100
Intestin de Cobaye	0,25	0,12			100
Coeur de Rat	0,12	0,11			97
Cerveau "	0,25	0,13			92
Foie "	0,12	0,04			100
" "	0,25	0,08			100
Rein "	0,12	0,07			87
" "	0,25	0,14			87
" "			0,12	0,07	86
" "			0,25	0,14	83

– Expériences du 4ème groupe

Expériences in vitro : Au cours des six essais réalisés avec des homogénats de tissus de rats adultes carencés nous avons observé par addition de vitamine D_3 une inhibition constante de l'activité de différents tissus (coeur ($P < 0,01$) – rein – cerveau – foie). Une inhibition a de même été observée avec un homogénat de rein de jeune rat rachitique. L'homogénat de muqueuse d'intestin grêle de jeune rat rachitique comme celui de rat adulte et contrairement à ceux de cobaye et de poulet rachitique ne présente aucune activité succinodéshydrogénasique ; chez le rat et le poulet rachitiques, comme chez le cobaye, la vitamine D_3 est sans action au niveau de la muqueuse intestinale ($P > 0,05$ dans le cas du poulet (8 essais)). Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXII et les figures 16 et 17.

Expériences semi-in vitro : On ne remarque aucune différence sensible dans les $Q\,0_2$ avant et après absorption de vitamine D :

- pour les homogénats d'intestins de poulets rachitiques (9 poulets)
- pour les homogénats de coeur de rats carencés (2 rats).

TABLEAU XXII

Action de la vitamine D_3 sur l'activité succinodéshydrogénasique d'homogénats tissulaires de rats carencés ou rachitiques de cobaye et de poulets rachitiques

Les résultats sont exprimés en pourcentages des $Q\,0_2$ des homogénats témoins

Homogénats	Vitamine D_3		$Q\,0_2$	
	µmoles	µmoles/mg sec	pourcentage de variation	
Témoins	–	–	100	
Coeur de rat carencé	0,05	0,06	80	
" " "	0,06	0,06	36	
" " "	0,12	0,11	80	P < 0,01
" " "	0,12	0,11	77	
" " "	0,12	0,14	59	
" " "	0,63	0,62	65	
Foie " "	0,05	0,04	66	
" " "	0,10	0,08	79	
Rein " "	0,25	0,15	48	
Cerveau " "	0,25	0,11	79	
Intestin de rat rachitique	0,12	0,07	100	
Rein " "	0,25	0,32	72	
Intestin de cobaye	0,25	0,12	100	
Coeur de poulet rachitique	0,24	0,30	100	
Intestin " "	0,24	0,29	143	
" " "	0,24	0,21	129	
" " "	0,24	0,30	145	
" " "	0,24	0,29	86	P > 0,05
" " "	0,24	0,24	108	
" " "	0,24	0,36	92	
" " "	0,24	0,36	109	
" " "	0,24	0,27	85	

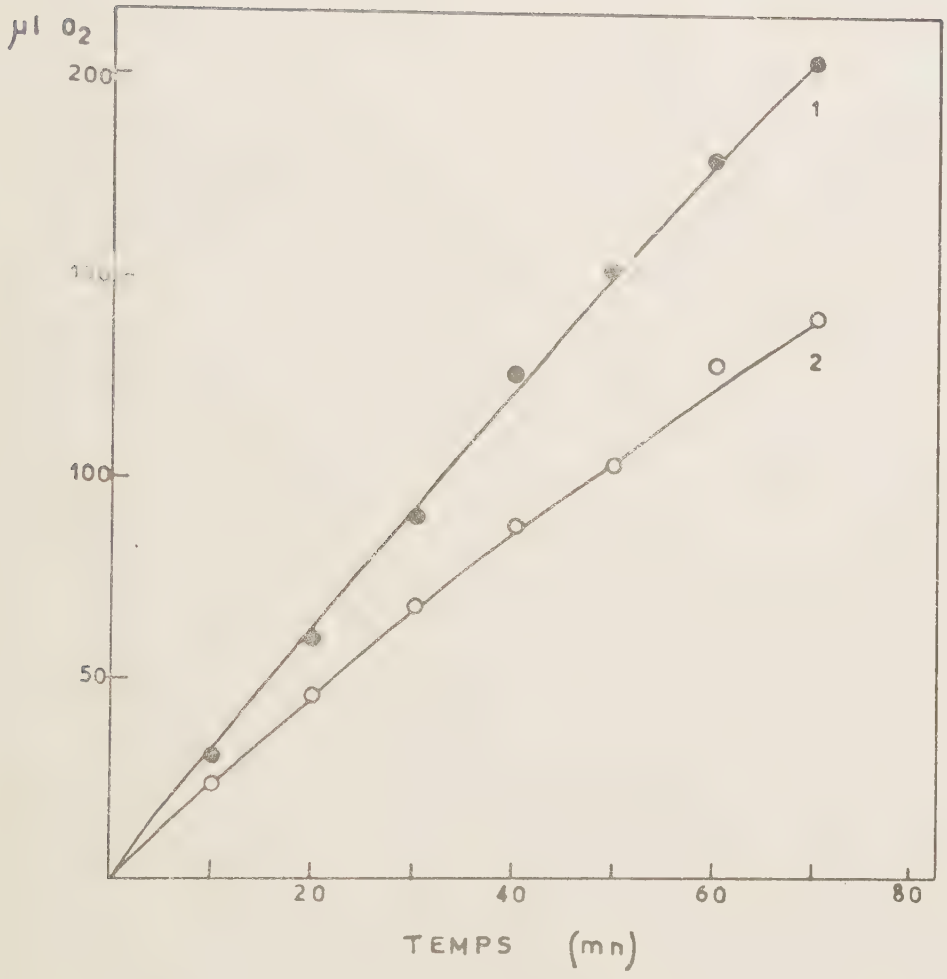


Figure 16 - Activité succinodéshydrogénasique d'un homogénat de tissu cardiaque de rat carencé. Courbes cumulatives de la consommation d'oxygène exprimée en µl d' O_2 absorbés par des mêmes quantités de tissus.

Courbe 1 : homogénat témoin

Courbe 2 : homogénat témoin + vitamine D_3 (0,06 µmoles)

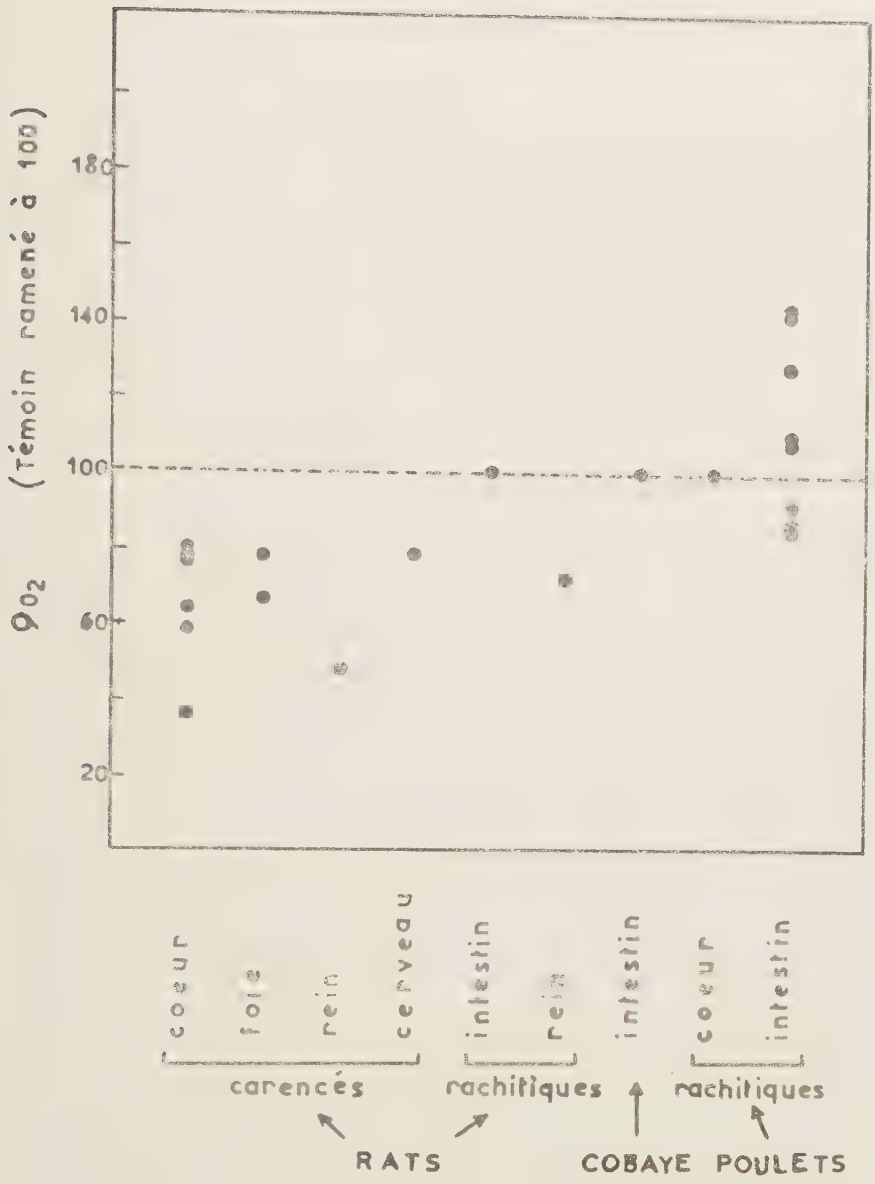


Figure 17 - Action de la vitamine D_3 in vitro sur l'activité succinodéshydrogénasique d'homogénats tissulaires de rats, cobaye et poulets.

Les consommations d'oxygène sont rapportées aux valeurs obtenues avec les homogénats témoins correspondants auxquels est affectée la valeur 100.

DISCUSSION

In vitro, la vitamine D_3 semble ne pas agir comme activateur du complexe succinodéshydrogénasique de la muqueuse d'intestin grêle du rat. Etant donné la présence d'acides gras inhibiteurs, une telle action activatrice pourrait être masquée, c'est pourquoi nous avons été conduits à renouveler ces expériences avec d'autres tissus : d'une part les muqueuses d'intestin de cobaye et de poulet, d'autre part différents tissus de rat et de poulet connus pour présenter une activité succinodéshydrogénasique importante.

Sans action sur les enzymes des muqueuses intestinales, la vitamine D_3 s'est révélée chez le rat un inhibiteur des enzymes d'autre provenance et non un activateur, dans les conditions dans lesquelles nous opérons, c'est-à-dire en présence de découplant et d'homogénat, donc dans un milieu assez complexe qui peut fort bien transformer la vitamine. Il faut rapprocher ces résultats de ceux obtenus par DE LUCA et STEENBOCK (26) qui étudiaient, in vitro, l'action des vitamines D en suspension grâce à du propylène glycol, sur l'oxydation de différents substrats (métabolites du cycle de KREBS) en présence de mitochondries rénales isolées dans des conditions permettant le maintien des phosphorylations oxydatives. Les auteurs constataient une réduction marquée de l'oxydation des citrates et isocitrates, réduite de celle du glutamate et du β hydroxybutyrate, nulle de celle de l'α cétoglutarate, du succinate et du pyruvate + oxalacétate. Mais ils opéraient en préservant le couplage et surtout avec un système très purifié et non avec un homogénat. Dans nos propres expériences, l'action ne se manifeste de façon significative que lorsqu'enzyme et inhibiteur sont laissés en contact à pH 6,1 à 37,1° C pendant 10 minutes avant le démarrage de la réaction ; signalons qu'il est bien connu que le pH de l'inhibition varie avec les inhibiteurs et est souvent très différent du pH d'action de l'enzyme. Rien n'indique que ce pH ne peut être réalisé localement dans le cytoplasme cellulaire ou dans les mitochondries : le pH intramitochondriale normal serait égal à 6,6 selon ROBIN (113).

La concentration en vitamine D réalisée dans la fiole de WARBURG pour une dose moyenne de 50 μg était de 4.10^{-2} mM (1 mM de vitamine D_3 = 396 μg/ml) ; l'hématine, inhibiteur connu de la succinodéshydrogénase, agit à la concentration de 2.10^{-1} mM ; l'acide acétylène dicarboxylique à la concentration de 3,3 mM. Cette concentration est élevée par rapport à la concentration sanguine physiologique que l'on peut évaluer à 3 U.I. soit 0,10 μg/ml de sérum chez le rat (132) soit environ 200 fois plus ; cependant avec une préparation tissulaire qui suppose la rupture des membranes cellulaires, il est fort possible qu'une grande partie du sécostéroïde ajouté au milieu soit fixée sur des structures autres que sa cible naturelle.

De plus, en suspension hydroalcoolique à 37,1° C la vitamine D_3 se détruit. Après 50 minutes et extraction éthérée, le spectre ultraviolet ne présente plus de maximum d'absorption à 265 mμ mais un plateau entre 255 et 262 mμ.

Enfin, dans le dernier groupe d'expériences in vitro, en l'absence d'enzyme, on constate l'existence d'une certaine consommation d'oxygène (42 μl en 80 mn) les réactifs en présence étant les suivants : succinate, cytochrome C, éthanol, Ca^{++}, Al^{+++}, $PO_4^{=}$ et vitamine D_3 (50 μg), alors que la seule vitamine D_3 (50 μg) en suspension hydroalcoolique ne consomme pas d'oxygène. Cette observation permet de penser que l'inhibition observée doit, en réalité, être plus forte, le $Q\,0_2$ étant augmenté artificiellement, mais qu'elle peut être provoquée non par la vitamine D elle-même, mais par des produits de décomposition.

Cette action in vitro de la vitamine D est donc sans rapport avec le mécanisme de l'absorption intestinale du calcium mais peut-être avec les autres actions tissulaires de ce corps. Il faut signaler à ce propos une action qu'elle partage d'ailleurs avec les autres vitamines liposolubles et plusieurs autres composés organiques, d'accélération de la libération de phosphatase acide par les lysosomes (24). Dans ses travaux les plus récents, le groupe de DE LUCA, n'étant semble-t-il, arrivé à aucune conclusion définitive quant à une modification d'activité des enzymes du cycle de KREBS, a orienté différemment ses recherches ; c'est ainsi que ces auteurs font état d'une facilitation tant in vitro qu'in vivo, de la libération du calcium préalablement fixé par les mitochondries de rein de rat (31). Tout récemment (42), utilisant des carences vitaminiques mixtes ils arrivent à séparer les effets de la vitamine D sur les citrates de ceux sur le métabolisme minéral en général, les premiers pouvant être une simple conséquence de l'action biochimique fondamentale de la vitamine D qui, il faut bien le dire, reste actuellement inconnue.

CONCLUSION

En conclusion, la vitamine D_3 semble intervenir in vitro dans la déshydrogénation du succinate. Lorsque l'enzyme en cause est inclus dans un homogénat tissulaire de rat carencé en vitamine D, par addition de cette dernière nous obtenons après 10 minutes de contact entre enzyme et vitamine à pH = 6,1 une inhibition marquée et constante de l'action de l'enzyme de divers tissus se traduisant par une diminution de 20 à 60 pour cent du $Q\,0_2$ pour une concentration moyenne 4.10^{-2} mM de vitamine D_3.

*

* *

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

1) - Si l'intervention de la vitamine D sur l'absorption intestinale du calcium peut être considérée comme démontrée, il est loin d'en aller de même pour ses modalités comme pour son mécanisme intime. Partant d'observations anciennes sur l'existence d'une activité antirachitique dans un extrait de surrénales en provenance d'un animal traité par de la vitamine D, nous avons pu montrer, malgré la petitesse des doses physiologiques administrées, l'existence d'une localisation surrénalienne préférentielle de la vitamine D_3. Ce corps injecté par voie intra-veineuse au rat, se retrouve après trente minutes en proportion très notable dans ses glandes surrénales. Nous y avons à plusieurs reprises décelé jusqu'à 60 pour cent de la quantité injectée, les chiffres obtenus par les méthodes physico-chimiques étant confirmés par le dosage biologique. Certes la quantité absolue ainsi stockée momentanément est assez inconstante, mais la concentration reste toujours étonnament importante, dépassant de loin celle réalisée dans le foie qui est pourtant considéré comme l'organe le plus riche : elle est au minimum égale à cinq fois celle retrouvée dans le foie. Ce dernier fait, contrôlé par l'emploi de vitamine D_3 marquée au tritium, s'accorde d'ailleurs complétement avec les résultats obtenus par d'autres auteurs soit antérieurement avec des doses considérablement supérieures, soit postérieurement avec des doses plus faibles de vitamines D marquées au carbone 14.

Le sort de la vitamine D momentanément présente dans les surrénales n'a pas pu être éclairci avec précision. Il semble qu'à côté d'une élimination assez rapide une transformation ait lieu in situ si l'on en juge par l'évolution de l'absorption ultraviolette en fonction du temps.

2) - Il restait à savoir si ce passage par les capsules surrénales se traduisait par la formation d'un corps directement actif. Si tel était le cas, l'ablation des glandes devait empêcher la vitamine D d'agir. En opérant sur le rat, nous avons pu conclure à l'absence d'interaction fondamentale entre la vitamine D et les capsules surrénales vis-à-vis de l'absorption du calcium. Toutes deux interviennent mais de façon semble-t-il indépendante. La vitamine D, administrée per os aux doses de 10, 100 ou 1000 unités internationales augmente, en effet, de façon constante, cette absorption chez des rats carencés surrénalectomisés. Les capsules surrénales ont, elles-mêmes,une action favorable sur cette absorption.

3) - Tentant alors d'en approfondir les modalités, nous avons repris la question, non encore éclaircie, de l'acidification du milieu intestinal à laquelle conduit l'administration de vitamine D. Partant de l'hypothèse d'une accélération des processus d'acidification enzymatique par la vitamine nous avons cherché si, en activant la succinodéshydrogénase

de la muqueuse, elle ne pourrait provoquer une libération d'ions hydrogène. La vitamine D n'active pas in vitro cet enzyme. Elle se montre, par contre, un inhibiteur au niveau de tissus musculaire, glandulaire et nerveux. Ceci permet de supposer que son action sur la succinodéshydrogénase ne se relie pas à l'absorption du calcium mais à quelqu'une de ses autres fonctions dans l'organisme animal, d'ailleurs non éclaircie.

* * *

BIBLIOGRAPHIE

1 - ARAKI M., CHIN S. et RYO K.,
J. Vitaminol.,Jap. 1957,3,61

2 - Assoc.of Official Agr. Chem.,
"Off.Tent.Met.Anal.", 6ème edit.,p.625,1945

3 - BARNICOT N.A.,
J.Anat., 1948,82,233

4 - BARRY B.A., MATTHEWS J. et SMYTH D.H.,
J. Physiol., 1961,157,279

5 - BENOIT J., FABIANI G., GRANCAUD R. et CLAVERT J.,
C.R. Soc.Biol., 1941,135,1602

6 - BLUMBERG A., AEBI H. et HURNI H.,
Helv.Physiol. Pharmacol.Acta, 1960,18,56

7 - BRUCHMANN E.E.,
Naturwissenschaften, 1961,48,525

8 - BUKHIN V.N., GARKINA I.N.,
Biokhimija, 1961,26,34

9 - CHANG H.,
Anat.Rec., 1951,111,23

10 - CHARLEY P. et SALTMAN P.,
Science U.S.A., 1963,139,1205

11 - CHENG C.H.W. et SHANK R.E.,
Feder.Proc., 1956,15,231

12 - CHIU C.Y.,
Biochem.J., 1950,46,120

13 - CLARK I. et BASSETT C.L.,
J.Exper.Med., 1962,115,147

14 - COATES M.E. et HOLDSWORTH E.S.,
Brit.J.Nutrit., 1961,15,131

15 - COHEN P.P.,
in "Manometric techniques", UMBREIT W.W. et coll., BURGESS edit.,
Minneapolis, 1957

16 - COLLINS E.J., GARRETT E.R. et JOHNSTON R.L.,
Metab.Clin.Exp., 1962,11,716

17 - CONWAY E.J. et HINGERTY D.,
Biochem.J., 1946,40,561

18 - COPP D.H., CAMERON E.C., CHENEY B.A., DAVIDSON A.G.F. et HENZE K.G.,
Endocrinology, 1962,70,638

19 - COPPENS P.A. et METZ G.A.,
Arch.Néerl.Physiol., 1933,18,407

20 - CRAMER C.F. et DUECK J.,
Am.J.Physiol., 1962,202,161

21 - CRAWFORD J.D., GRIBETZ D. et TALBOT N.B.,
Am.J.Physiol., 1955,180,156

22 - CRUICKSHANK E.M. et KODICEK E.,
Biochem.J., 1956,64,24 P

23 - CRUICKSHANK E.M., KODICEK E. et ARMITAGE P.,
Biochem.J., 1954,58,172

24 - DE DUVE C., WATTIAUX R. et WIBO M.,
Biochem.Pharmacol. 1962,9,97

25 - DE LUCA H.F., GUROFF G., STEENBOCK H., REISER S. et MANNATT M.R.,
J.Nutrit., 1961,75,175

26 - DE LUCA H.F. et STEENBOCK H.,
Science U.S.A., 1957,126,258

27 - DEUEL H.J.,
The Lipids, Interscience Publishers edit., New-York, 1957,Vol.III, p.652

28 - DIKSHIT P.K.,
Nature, 1959,183,334

29 - DIKSHIT P.K., JOSHI J.G. et PATWARDHAN V.N.,
Ind.J.Med.Res., 1956,44,719

30 - DOWDLE E.B., SCHACHTER D. et SCHENKER H.,
Am.J.Physiol. 1960,198,269

31 - ENGSTRÖM G.W. et DE LUCA H.F.,
J.Biol.Chem., 1962,237,PC 974

32 - ESTABROOK R.W.,
Feder.Proc., 1955,14,45

33 - FESTENSTEIN G.N.,
Biochem.J., 1955,59,605

34 - FINKELSTEIN J.D. et SCHACHTER D.,
Am.J.Physiol., 1962,203,873

35 - FOURNIER P.,
C.R.Acad.Sci., 1954,239,718

36 - FOURNIER P. et DUPUIS Y.,
Bull.Soc.Sci.Hyg.Aliment., 1960,48,33

37 - GAILLARD P.J.,
in "The Parathyroids," Thomas,edit., Springfield, 1961

38 - GAUTIER J.A. et PIGNARD P.,
Ann.Pharm.Fr., 1953,11,438

39 - GESCHWIND I.I.,
in "Mineral Metabolism", COMAR C.L. et BRONNER F., Acad.Press,edit., New-York, 1961, I.B.

40. - GJEDDEBAEK N.F. et LUND A.,
Acta Pharmacol.Toxicol., 1959,16,1

41 - GORDON H.T. et HEWEL C.A.,
Anal.Chem., 1955,27,1471

42 - GOROFF G.H., DE LUCA H.F. et STEENBOCK H.,
Am.J.Physiol., 1963,204,833

43 - GRAN F.C.,
Acta Physiol.Scand., 1960,49,211

44 - GREAVES J.D. et SCHMIDT C.L.A.,
J.Biol.Chem., 1933,102,101

45 - GROLLMAN A.,
Endocrinology, 1941,29,815

46 - HAAVALDSEN R. et NICOLAYSEN R.,
Acta Physiol.Scand., 1956,36,102

47 — HANSSLER H.,
Klin.Wschr., 1956,34,646

48 - HARRIS R.S.,
Feder.Proc., 1959,18,1100

49 - HARRISON H.E. et HARRISON H.C.,
Feder.Proc., 1959,18,1085

50 - HARRISON H.E. et HARRISON H.C.,
Am.J.Physiol., 1960,199,265

51 - HARRISON H.C., HARRISON H.E. et PARK E.A.,
Am.J.Physiol., 1958,192,43

52 - HERTELENDY F. et TAYLOR T.G.,
Biochim.Biophys.Acta., 1960,44,200

53 - HURIEZ C. et TUCHMANN-DUPLESSIS H.,
Excerpta Med., 1954,8,425

54 - IRVING J.T.,
Calcium Metabolism, Methuen et C°, Londres, 1957

55 - JACKSON C.M. et CARLETON R.,
Am.J.Physiol., 1923,65,1

56 - JELLINEK M. et COOPER T.,
Am.J.Physiol., 1963,204,673

57 - JOSHI J.G., DIKSHIT P.K. et PATWARDHAN V.N.,
Ind.J.Med.Res., 1957,45,439

58 - KEILIN D. et HARTREE E.F.,
Biochem.J., 1949,44,205

59 - KIMBERG D.V., SCHACHTER D. et SCHENKER H.,
Am.J.Physiol., 1961,200,1256

60 - KNUDSON A. et FLOODY R.J.,
J.Nutrit., 1940,20,317

61 - KODICEK E.,
Biochem.J., 1955,60,XXV

62 - KODICEK E.,
Biochem.J., 1956,64,25 P

63 - KODICEK E.,
Rec.Med.Veter., Ec.Alfort , 1961,137,747

64 - KODICEK E. et ASHBY D.R.,
Biochem.J., 1954,57,XIII

65 - KODICEK E. et ASHBY D.R.,
* Biochem.J., 1960,76,14 P

66 - KODICEK E., CRUICKSHANK E.M. et ASHBY D.R.,
Biochem.J., 1960,76,15 P

67 - KRANE S.M., BROWNELL G.L., STANBURY J.B. et CORRIGAN H.,
J.Clin.Invest., 1958,35,874

68 - KUN E. et ABOOD L.G.,
Science U.S.A., 1949,109,144

69 - LANDELIUS E. et LJUNGKVIST G.,
Skand.Arch.Physiol., 1934,68,252

70 - LASSITER W.E., GOTTSCHALK C.W. et MYLLE M.,
Feder.Proc., 1962,21,435

71 - LEDERER E. et LEDERER M.,
"Chromatography, A review of principles and applications"
Elsevier, edit., New-York, 1957

72 - LEEMSKA C.H.W., DE GRAEFF J. et DE COCK J.,
Acta Med.Scand., 1957,156,455

73 - LENGEMANN F.W.,
J.Nutrit., 1959,69,23

74 - LENGEMANN F.W. et COMAR C.L.,
Am.J.Physiol., 1961,200,1051

75 - LENGEMANN F.W., WASSERMAN R.H. et COMAR C.L.,
J.Nutrit., 1959,68,443

76 - LINDQUIST B.,
Acta paediatr., 1952,41,82

77 - LISON L.,
"Statistique appliquée à la Biologie expérimentale",
Gauthier-Villars,édit., Paris, 1958, p.230

78 - Mc CHESNEY E.W. et KOCHER H..
Proc.Soc.Exptl.Biol.and Med., 1941,47,156

79 - MANUNTA G., SAROFF J. et TURNER C.W.,
Proc.Soc.Exptl.Biol.and Med. 1957,94,785

80 - MARNAY C.,
J.Physiol.Fr., 1961,53,423

81 - MARNAY C. et PRELOT M.,
Arch.Sci.Physiol., 1957,11,77

82 - MARNAY C. et RAOUL Y.,
C.R.Soc.Biol., 1959,153,1949

83 - MARNAY C. et RAOUL Y.,
C.R.Soc.Biol., 1960,154,1766

84 - MAYER A., PICARD C.W. et WOKES F.,
Pharm.Acta.Helv., 1958,33,603

85 - MIGICOVSKY B.B.,
Canad.J.Biochem.Physiol., 1957,35,1267

86 - MUNIER R. et MACHEBOEUF M.,
Bull.Soc.Chim.Biol., 1949,31,1144

87 - MUNSON P.L., HIRSCH P.F. et TASHJIAN A.H.,
Annu.Rev.Physiol., 1963,25,325

88 - NAKAMURA M., PICHETTE P., BROITMAN S., BEZMAN A.L., ZAMCHECK N., VITAL
J.Biol.Chem., 1959,234,20

89 - NASON A. et LEHMAN I.R.,
J.Biol.Chem., 1956,222,511

90 - NEUFELD H.A., SCOTT C.R. et STOTZ E.,
J.Biol.Chem., 1954,210,869

91 - NEUMAN W.F. et DOWSE C.W.,
in "The parathyroids", Thomas, edit., Springfield, III, 1961, p. 310.

92 - NICHOLS G., SCHARTUM S. et VAES G.M.,
Acta Physiol.Scand., 1963,57,51

93 - NICOLAYSEN R.,
Biochem.J., 1937,31,107

94 - OGASAWARA K.,
Seikagaku., 1956,28,41

95 - PANOS T.C., KLEIN G.F.et FINERTY J.C.,
J.Nutrit., 1959,10,50

96 - PESEZ M.,
Bull.Soc.Chim.Fr., 1949,5,507

97 - POTTER V.R.,
in "Manometric techniques", UMBREIT W.W. et coll., Burgess, edit., Minneapolis, 1957

98 - POTTER V.R., SIEKEVITZ P., SIMONSON H.C.,
J.Biol.Chem., 1953,205,893

99 - PRELOT M.,
Thèse Pharm. (Etat), Paris, 1958

100 - PRELOT M., GUERILLOT-VINET A. et BAZIER R.,
Arch.Sci.Physiol., 1958,12,45

101 - RAHANDRAHA T. et RATSIMAMANGA A.R.,
Bull.Soc.Chim.Biol., 1956,38,897

102 - RAOUL Y.,
Internation.Z.Vitaminforsch., 1958,28,306

103 - RAOUL Y., LE BOULCH N., BARON C., BAZIER R. et GUERILLOT-VINET A.,
Bull.Soc.Chim.Biol., 1956,38,495

104 - RAOUL Y., LE BOULCH N., BARON C., BAZIER R. et GUERILLOT-VINET A.,
Bull.Soc.Chim.Biol., 1956,38,885

105 - RAOUL Y. et MARNAY C.,
J.Physiol.,Fr., 1958,50,471

106 - RAOUL Y. et MARNAY C.,
Ann.Nutrit.Aliment., 1961,15, B 231

107 - RAOUL Y., MARNAY C., LE BOULCH N., GUERILLOT-VINET A. et GOUNELLE H.,
Ann.Pharm.Fr., 1959,17,481

108 - RAOUL Y. et MEUNIER ,
C.R.Acad.Sci., 1939,209,546

109 - RASMUSSEN H.,
Endocrinology, 1959,65,517

110 - RASMUSSEN H. et REIFENSTEIN E.C.,
"The parathyroid glands", in "Textbook of Endocrinology", WILLIAM R.H. Saunders,edit., Philadelphie, 1962

111 - RASMUSSEN H. et REIFENSTEIN E.,
in "Textbook of Endocrinology", WILLIAMS R.H.,
Saunders,edit., Philadelphie,1962, p.777

112 - RINALDI S.,
Ann.Ottalmol.Clin.Ocul., 1937,65,667

113 - ROBIN E.D.,
New Ing.J.Med., 1961,265,780

114 - ROCHE J.,
Exp.Ann.Bioch.Med., 1944,4,219

115 - SAFFRAN M. et SCHALLY A.V.,
Endocrinology, 1955,56,523

116 - SALLIS J.D. et HOLDSWORTH E.S.,
Am.J.Physiol., 1962,203,506

117 - SCHABAD J.A.,
Z.Klin.Med., 1909,69,436

118 - SCHACHTER D., KIMBERG D.V. et SCHENKER H.,
Am.J.Physiol., 1961,200,1263

119 - SCHACHTER D. et ROSEN S.M.,
Am.J.Physiol., 1959,196,357

120 - SCHNEIDER W.C. et POTTER V.R.,
J.Biol.Chem., 1943,149,217

121 - SINGER T.P. et KEARNEY E.B.,
Methods of Biochemical Analysis, 1957,4,307

122 - SOBEL A.E.,
Metab.Inter.5th J.Macy Conf., 1953, 43

123 - SORRELS M.F. et REISE R.,
J.Amer.Oil Chemists'Soc., 1957,34,131

124 - STAPLETON T. et EVANS I.W.J.,
Helv.paediatr.Acta , 1955,10,149

125 - STEENBOCK H. et BLACK A.,
J.Biol.Chem., 1924,61,403
1925,64,263

126 - SUZUKI T. et SAHASHI Y.,
J.Vitaminol., Jap., 1957,3,288

127 - TALMAGE R.V.,
Ann.New-York Acad.Sci., 1956,64,326

128 - TALMAGE R.V. et ELLIOTT J.R.,
Feder.Proc., 1958,17,160

129 - TALMAGE R.V. et KRAINTZ F.W.,
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1954,87,263

130 - TALMAGE R.V., KRAINTZ F.W. et BUCHANAN G.D.,
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1955,88,600

131 - TAYLOR N.B. et CAVEN W.R.,
Am.J.Physiol., 1927,81,511

132 - THOMAS W.C., MORGAN H.G., CONNOR T.B., HADDOCK L., BILLS C.E. et HOWARD
J.Clin.Invest., 1959,38,1078

133 - THOMSON J.F.,
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1959,101 (4) 589

134 - TIBBETTS D.M. et AUB J.C.,
J.Clin.Invest., 1937,16,511

135 - TOVERUD S.U.,
in "The Transfer of calcium and Strontium across Biological Membranes"
WASSERMAN R.H., Academic Press,edit., New-York, 1963

136 - TSUNO K.,
Tokushima J.Exper.Med., 1961,8,41

137 - VAN DEN BOS B.G.,
Thèse Math.Phys., Leyde, 1956

138 - VAUGHAN O.W. et FILER L.J.,
J.Nutrit., 1960,71,10

139 - VELLUZ L.,
C.R.Acad.Sci., 1961,253,603

140 - VITALE J.J., JANKELSON O.M., CONNORS P., HEGSTED D. et ZAMCHECK N.,
Am.J.Physiol., 1956,187,427

141 - WASSERMAN R.H.,
J.Nutrit., 1962,77,69

142 - WASSERMAN R.H. et COMAR C.L.,
Endocrinology, 1961,69,1074

143 - WASSERMAN R.H. et KALLFELZ F.A.,
Am.J.Physiol., 1962,203,221

144 - WASSERMAN R.H. et LENGEMANN F.W.,
J.Nutrit., 1960,70,377

145 - WESSON Y.G.,
Science U.S.A., 1932,75,339

146 - WESSON L.G. et LAULER D.P.,
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1959,101,235

147 - WIDMER C., CLARL H.W., NEUFELD H.A. et STOTZ E.,
J.Biol.Chem., 1954,210,861

148 - WILLIAMS R.H.,
Textbook of Endocrinology, Saunders,edit., Philadelphie 1962.

149 - ZAR L. et IRVING J.T.,
Nature,1959, 184,(suppt 18) 1410

150 - ZETTERSTRÖM R.,
Acta Chem.Scand., 1951,5,343

151 - ZETTERSTRÖM R., LJUNGGREN M.,
Acta Chem.Scand., 1951,5,283

152 - ZUCKER T.F. et MATZNER M.J.,
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1924,21,186

* *

TABLE des MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1

PREMIERE PARTIE

METABOLISME DE LA VITAMINE D ET GLANDES SURRENALES

- Position du problème - Rappel des travaux antérieurs	8
- Techniques de caractérisation et de dosage des vitamines D	10
A/ Méthodes biologiques	10
B/ Méthodes physico-chimiques	10
- Etudes in vivo	12
I - Technique	12
II - Résultats expérimentaux	24
- Etudes in vitro	31
I - Technique	31
II - Résultats expérimentaux	34
- Discussion	37
- Conclusion	39

DEUXIEME PARTIE

INTERRELATIONS SURRENALES-VITAMINE D DANS L'ABSORPTION CALCIQUE

- Position du problème - Rappel des travaux antérieurs	41
A/ Absorption gastro-intestinale du Calcium	41
B/ Interrelations surrénales-vitamine D	43
- Technique de mesure de l'absorption calcique	46
A/ Mise au point de la technique	46
B/ Expériences préliminaires	48
C/ Technique	50
D/ Programme d'analyse statistique	56

- Résultats expérimentaux 64
A/ Rats témoins 66
B/ Rats surrénalectomisés 66
- Discussion 74
- Conclusion 79

TROISIEME PARTIE

ACTION DE LA VITAMINE D SUR LE SYSTEME SUCCINODESHYDROGENASIQUE DE L'INTESTIN ET DE DIVERS TISSUS DU RAT, DU POULET ET DU COBAYE

- Position du problème - Rappel des travaux antérieurs 81
- Méthode de KUN et ABOOD 83
- Méthode de SCHNEIDER et POTTER 83
A/ Technique 84
B/ Programme d'analyse statistique 91
C/ Résultats expérimentaux 93
- Discussion 99
- Conclusion 100

CONCLUSIONS GENERALES 102

BIBLIOGRAPHIE 104

TABLE DES MATIERES 113

*
* *